



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

고지방 식이로 유도한 비만 마우스에서
잣기름이 간 지방증의 발생에
미치는 영향

The effect of pine nut oil on
the development of hepatic steatosis
in high-fat diet-induced obese mice

2013 년 2 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

박 소 영

국 문 초 록

고지방 식이로 유도한 비만 마우스에서 젓기름이 간 지방증의 발생에 미치는 영향

서울대학교 대학원 식품영양학과

박 소 영

비만 인구의 증가와 함께 비알콜성 지방간의 유병률이 전 세계적으로 높은 수치를 기록하고 있으며, 이에 따라 비알콜성 지방간의 치료 및 예방을 위한 효과적인 식이중재 방법의 개발이 요구되고 있다. 젓기름은 식욕 조절, 콜레스테롤 강하 등의 효과가 있는 것으로 보고되었다. 젓기름이 체중 조절 및 간 지방 축적 억제에도 효과가 있다는 보고가 있으나 그 수가 제한적이며 추가 연구가 필요한 실정이다. 본 연구에서는 고지방 식이 중 일부를 젓기름으로 대체하였을 때 젓기름이 고지방 식이로 유도한 간 지방증을 완화할 수 있는지를 알아보고자 하였다. 5 주령 C57BL 마우스에게 콩기름 또는 젓기름으로 지방 급원을 달리한 고지방 식이 또는 일반 식이를 12 주간 공급하였다. 고지방 식이는 45% 칼로리를 지방에서 공급하며 이중 이 중 10% (S10, P10),

20% (S20, P20), 30% (S30, P30)를 콩기름 또는 잣기름으로 대체하고 나머지는 라아드로 공급하였다. 일반 식이군은 10% 칼로리를 콩기름 (SC) 또는 잣기름 (PC)으로 공급하였다. 체중, 식이 섭취량, 간 지질 농도, 간에서 지방합성 및 산화 관련 유전자의 mRNA 수준, 백색지방에서 SIRT3 단백질 발현량을 측정하였다. 고지방 식이 섭취군 중 P10, P20, P30 군은 각각 S10, S20, S30 군에 비해 각각 체중 증가량 및 백색 지방 무게가 적어, 고지방 식이로 유도한 비만 마우스에서 잣기름이 콩기름에 비해 체중 증가 및 백색 지방 축적을 억제하였음을 확인하였다. 일반 식이 섭취군에서도 PC 군이 SC 군에 비해 백색 지방 무게가 적었다. 한편, 고지방 식이 섭취군 중 P30 군은 S30 군보다 칼로리 섭취량이 유의적으로 적은 것으로 나타났으나 그 외 P10, P20 군과 잣기름 일반 식이 섭취군인 PC 군은 각 대조군과 칼로리 섭취량에 유의적인 차이가 없었다. 간 중성지방 농도는 고지방 식이 섭취군 중 P10 군에서 S10 군에 비해 유의적으로 낮았으며, 일반 식이 섭취군과 비슷한 수준이었다. 따라서, 추후 잣기름의 간 지방증 완화 효과에 기여한 세부 기전에 대한 분석은 일반 식이 섭취군의 SC, PC 군과 고지방 식이 섭취군의 S10, P10 군을 대상으로 수행되었다. 잣기름 섭취군은 전반적으로 간 조직에서 *Acadl* (long-chain acyl-CoA dehydrogenase) mRNA 수준이 높았다. 따라서, P10 군에서 간 중성지방 축적이 낮은 것은 지방산화의 증가에 일부 기인하였을 가능성이 있다. 간 조직에서 *Pparg* (peroxisome proliferator activated

receptor gamma) mRNA 의 수준은 PC 군에서 SC 군에 비해 유의적으로 낮았다. 또한, 칼로리제한 식이 섭취 시 발현이 증가하는 것으로 알려진 SIRT (sirtuin)3 단백질이 S10 군의 백색지방 조직에서는 현저하게 저하되어 있었던 반면, P10 군에서는 일반 식이 섭취군에서와 비슷한 수준을 유지함을 확인하였다. 이는 잣기름이 백색지방 조직에서 고지방 식이 섭취에 따른 SIRT3 의 발현 감소로 인해 초래되는 미토콘드리아 기능 저하 및 손상을 완화할 수 있음을 시사한다. 결론적으로, 본 연구에서는 잣기름의 섭취가 고지방 식이 및 일반 식이 섭취군에서 체지방 축적을 억제하고, 고지방 식이로 유도한 비만에서 간 지방증을 완화하였음을 확인하였다. 잣기름 대체가 칼로리제한과 비슷한 효과를 유발함으로써 고지방 식이 섭취에 따른 체지방 축적을 억제하고 전반적인 체내 에너지 대사를 개선한 것으로 사료된다.

주요어: 잣기름, 비만, 고지방 식이, 간 지방증, SIRT3

학번: 2011-21640

목 차

국문초록	i
목차	iv
표 목차	vi
그림 목차	vii
부록 목차	ix

I. 서론

1. 연구 배경	1
2. 연구 목적	3

II. 문헌 고찰

1. 비알콜성 지방간의 병리	4
2. 비알콜성 지방간의 발생과 관련된 지표	12
3. 잣기름의 특성 및 구성 성분	17
4. 잣기름의 효능	20

III. 연구 방법

1. 실험 설계 및 실험 동물 사육	24
2. 실험 식이	26
3. 시료 채취	29
4. 실험 방법	30

5. 통계 분석	42
IV. 실험 결과	
1. 체중, 백색 지방 및 간 무게, 식이 섭취량	43
2. 혈청 leptin 농도	47
3. 혈중 지질 농도	49
4. 간 지질 농도	51
5. 혈중 fetuin-A 농도 및 간 조직에서 fetuin-A mRNA 수준	53
6. 간 조직에서 지방산화 관련 지표들의 mRNA 수준	55
7. 간 조직에서 지방합성 관련 지표들의 mRNA 수준	57
8. 백색 지방 조직에서 SIRT3 의 단백질 발현	59
V. 고찰	61
VI. 요약	68
참고 문헌	70
약어 목록	77
부록	79
영문초록	100

표 목차

Table 1. Therapeutic strategies in the treatment of NAFLD	----- 11
Table 2. Composition of the experimental diets	----- 27
Table 3. Fatty acid composition of experimental diets	----- 28
Table 4. Primer sequences used in real-time quantitative PCR	----- 38
Table 5. Body weight, white adipose tissue weight, liver weight, food intake, and calorie intake of mice fed control or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil	----- 45

그림 목차

Figure 1. Pathways contributing to hepatic triglyceride accumulation	8
Figure 2. Structures of pinolenic acid, Δ^5 -unsaturated fatty acids, and positional isomers of pinolenic acid	19
Figure 3. The experimental design	25
Figure 4. Serum leptin level in mice fed control or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil	48
Figure 5. Serum lipids level in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil	50
Figure 6. Hepatic lipids level in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil	52
Figure 7. Serum fetuin-A level and relative fetuin-A mRNA level in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil	54
Figure 8. Relative mRNA level of genes involved in fatty acid oxidation in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil	56
Figure 9. Relative mRNA level of genes involved in lipogenic pathways in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil	58

Figure 10. Epididymal SIRT3 protein expression in mice fed control diets or
high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil ----- 60

부록 목차

Appendix 1. Impact of pine nut oil on weight gain and immune responses in	
high-fat diet-induced obese mice -----	79

I. 서론

1. 연구 배경

비만 인구의 증가와 함께 비알콜성 지방간 (nonalcoholic fatty liver disease) 유병률도 세계적으로 높은 수치를 기록하고 있다. 미국에서는 도시 인구의 삼분의 일이 간 지방증을 가지고 있다는 연구가 있으며 (Browning et al., 2004), 아시아 국가들에서도 16~18%에 달하는 유병률이 보고되어 있다 (Eguchi et al., 2012; Park et al., 2006).

비알콜성 지방간이란, 술을 마시지 않거나 소량 마실 뿐인데도 술을 많이 마시는 사람처럼 간에 지방이 축적되는 증상을 통칭하며, 한 가지 질환이 아니라 단순 지방증 (simple steatosis)에서부터 비알콜성 지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis), 간 섬유화증 (fibrosis) 및 간 경변 (cirrhosis)에 이르는 질환을 포함한다. 단순 지방증 단계에서는 특별한 병적 증상이 나타나지 않으나 잘 관리하지 않으면 단순 지방증이 비알콜성 지방간염, 간 섬유화증 및 간 경변으로 진행되어 심각한 합병증을 유발할 수 있으며, 극히 일부의 환자들에게서는 간 세포 암종 (hepatocellular carcinoma)으로 발전하기도 한다 (Yeh et al., 2007).

한국산 잣기름은 침엽수의 잎 또는 종실에 특이적으로 존재하는 지방산인 pinolenic acid (18:3, Δ 5,9,12)를 약 14% 포함한다 (Lee et al., 2004; Wolff et al., 2000). 한국산 잣기름은 식욕억제 (Pasman et

al., 2008; Hughes et al., 2008) 및 혈중 콜레스테롤 강하 (Asset et al., 2000; Asset et al., 2001) 효과가 있는 것으로 보고되었다. 한편, 최근의 두 연구에서는 잣기름이 다른 식물성 기름에 비해 체중 증가를 억제하고 (Ferramosca et al., 2008b) CLA 로 유도된 간 지방증을 완화할 수 있다는 결과가 발표되어 (Ferramosca et al., 2008a), 잣기름의 섭취가 체중 조절 및 지방간 발생 예방에 긍정적인 영향을 미칠 수 있음을 시사하였다. 그러나 아직 이에 대한 연구가 부족하여 관련 정보가 미흡한 실정이며, 보다 다양한 실험 디자인을 통해 잣기름의 효능을 추가적으로 검증할 필요가 있다고 사료된다.

2. 연구 목적

본 연구에서는 고지방 식이 중 일부를 잣기름으로 대체하였을 때 잣기름이 고지방 식이 섭취에 따른 체중 증가를 억제할 수 있는지에 대하여 확인하고자 하였다. 또한, 잣기름 섭취가 고지방 식이로 유도된 비만을 완화하였을 때, 비만 관련 간 질환인 간 지방증도 함께 완화할 수 있는지를 평가하였다. 고지방 식이 중 잣기름의 대체 정도를 달리하여 가장 효과적인 대체 정도에 대한 정보를 추가로 얻고자 하였으며, 가장 효과적인 대체 정도를 선택하여 잣기름의 간 지방증 완화 효과에 기여한 세부 기전에 대한 분석이 수행되었다. 고지방 식이 섭취군 외에도 일반 식이 섭취군을 함께 설정하여 고지방 식이의 효과를 제외한 잣기름의 독립적인 영향을 알아보았다.

II. 문헌 고찰

1. 비알콜성 지방간의 병리

비알콜성 지방간의 조직병리학적 변화

비알콜성 지방간의 전형적인 조직병리학적 특징은 간 세포에의 지방 축적이며, 심화 단계로 발전될수록 염증 및 섬유화 소견이 함께 발견된다. 단순 지방증 단계에서는 큰 지방구와 작은 지방구가 함께 섞여 있되 큰 지방구가 주로 나타나는 패턴의 지방변성 (macrovesicular steatosis)을 보이며, 비알콜성 지방간염으로 진행되면 세포가 부풀어 오르는 풍선 확장 (ballooning)과 함께 염증 세포의 군집점이 관찰된다. 계속되는 염증 반응으로 인해 섬유 모세포 (fibroblast)가 증식하여 정상 세포를 대체하면서 반흔 조직 (scar tissue)이 나타나면 간 경변으로의 진행이 촉진된다. 간 세엽 (liver acinus)에서 이와 같은 조직 병리학적 특징이 나타나는 영역은 심화 단계로의 진행에 따라 산소 및 영양 공급에 불리하여 가장 손상에 취약한 중심정맥 주변의 zone 3 (perisinusoidal)로부터 산소 및 영양 공급에 유리한 문맥 주변의 zone 1 (periportal/portal)으로 옮겨가는 경향을 보인다 (Brunt, 2007; Yeh, 2007).

지방 대사 불균형으로 인한 지방 축적

간의 비정상적인 지방 대사는 비만, 고혈당 및 인슐린 저항증, 고지혈증과 같은 대사 증후군의 요소들과 밀접한 상관 관계를 가지고 있다. 간 세포에 축적되는 중성지방의 공급원은 크게 지방 조직으로부터 유래한 유리지방산 (NEFA; non-esterified fatty acid), 음식을 통해 직접 섭취한 지방, 음식을 통해 섭취한 탄수화물을 이용하여 간 세포에서 새로 합성된 지방의 세 가지로 요약해 볼 수 있다. 이 중 지방 조직에서 지방분해 (lipolysis)를 통해 방출되어 혈중 순환을 통해 간으로 유입되는 유리지방산이 대사 증후군 및 지방간 발병에 가장 중요한 의미를 가진다. 말초 조직의 인슐린 감수성이 감소한 경우, 세포에서 포도당을 잘 수용하지 못할 뿐만 아니라 지방 세포에서는 지방분해 작용에 대한 억제가 잘 이루어지지 않게 되므로 혈중으로의 유리지방산 방출량이 증가하게 된다. 이에 따라 증가한 혈중 포도당과 지방산 농도는 간에서의 중성지방 합성을 촉진하고 간으로 유입되는 지방산의 양을 증가시켜, 결과적으로 간에 인슐린 저항증 및 지방증을 유발하는 인자로 작용하게 된다 (Liu et al., 2010). 특히 대사 증후군의 위험 요인으로 지적되는 내장지방은 피하지방에 비해 지방분해가 더 활발할 뿐 아니라 방출된 유리지방산이 간 문맥으로 직접 유입되므로 지방간 발생의 중요한 원인으로 작용한다.

말초 조직으로부터 과다하게 유입되는 지방산과 더불어, 간에서의 지방신생합성 (hepatic de novo lipogenesis) 기전의 활성화 역시 간

지방증을 촉진하는 요인으로 작용한다. 건강한 사람은 간의 지방신생합성이 공복 상태에서는 일어나지 않다가 식후에 일시적으로 증가하는 데 반해, 비알콜성 지방간 환자는 공복 상태에서도 간의 지방신생합성 수준이 증가되어 있으며 식후에도 더 이상 증가되지 않는 패턴을 보인다 (Ravikumar et al., 2005). 이처럼 지방간 환자들에게서는 간으로 유입되거나 간에서 생성되는 지방의 양이 증가하게 되고, 이에 따라 간으로부터의 VLDL (very low-density lipoprotein) 분비도 증가하게 된다. 그러나 간의 VLDL 분비 능력은 제한되어 있으므로, VLDL 을 통한 간으로부터의 지방 배출량이 간으로 유입되거나 간에서 생성되는 지방량에 미치지 못함에 따라 간의 지방 축적이 가속화된다고 (Fabbrini et al., 2008) (Figure 1).

염증성 물질과 산화적 스트레스로 인한 간 손상

간 내 지방축적이 증가하는 경우, 일부는 단순 지방증에서 증상이 그치지만 일부에서는 비알콜성 지방간염으로 진행되어 보다 심각한 간 세포 손상으로 이어진다. 비알콜성 지방간염에서 나타나는 간 세포의 손상 기전은 흔히 ‘two-hit hypothesis’ 로 설명된다. 첫 번째 단계는 앞서 서술한 바와 같이 간 내 중성지방 축적이 증가하여 단순 지방증이 유도되는 과정을 말한다. 간 내 지방축적은 간 세포를 염증성 사이토카인, 산화적 스트레스, 미토콘드리아 기능 장애 등에 의한 후속 영향에 취약하게 만들어, 결과적으로 두 번째 단계로서 염증 반응 및 섬유화,

조직 괴사를 동반한 심각한 간 손상을 유발할 수 있다 (Chavez-Tapia et al., 2009).

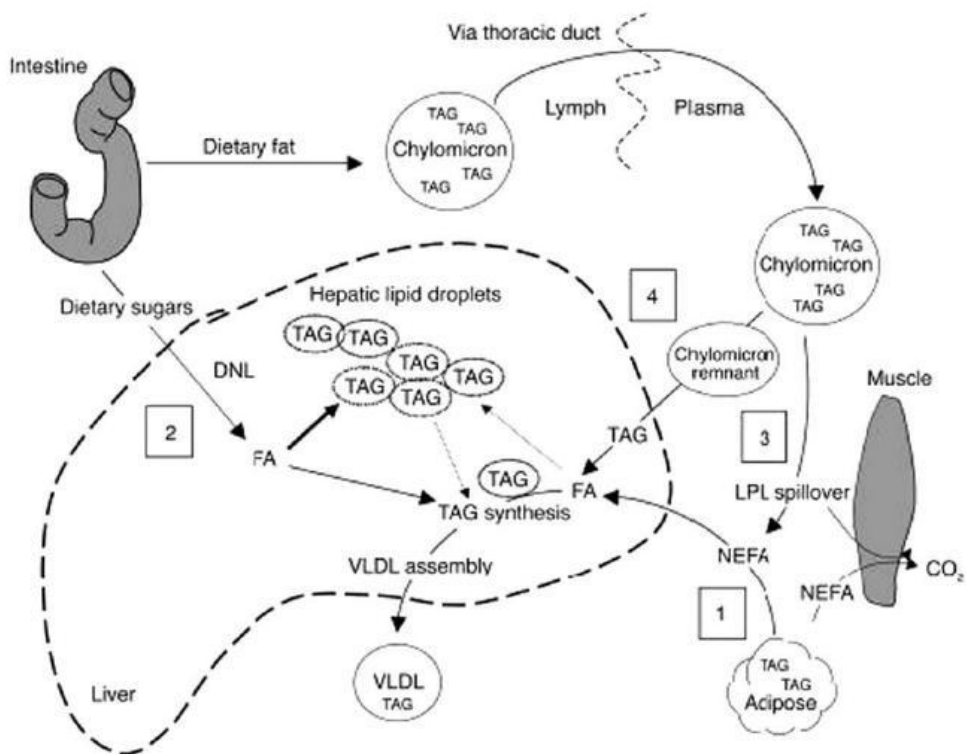


Figure 1. Pathways contributing to hepatic triglyceride accumulation (Musso et al., 2009)

DNL, de novo lipogenesis; TAG, triglycerides; LPL, lipoprotein lipase; NEFA, non-esterified fatty acids

염증성 경로의 만성적인 활성화는 인슐린 저항증의 중요한 원인으로 작용한다. 비알콜성 지방간 환자들은 혈액과 간에서 TNF (tumor necrosis factor)- α , IL (interleukin)-6 를 비롯한 염증성 사이토카인 수준이 증가되어 있으며 단순 지방증보다 비알콜성 지방간염일 때 더 높은 수준을 나타냈다 (Abiru et al., 2006; Bahcecioglu et al., 2005). 이처럼 간 내 지방 축적, 인슐린 저항증, 염증 반응은 서로 밀접 하게 연관되어 나타날 뿐 아니라 양성 피드백을 통해 증상을 강화시킨다. 이는 염증 반응을 일으키는 경로와 대사적 경로가 서로 접점을 가지고 있으며, 이 접점에서의 잘못된 신호 전달이 비알콜성 지방간과 2 형 당뇨병의 발병에 중심적인 역할을 수행하고 있음을 시사한다.

미토콘드리아 기능 장애 또한 비알콜성 지방간염으로의 진행에 중요한 요인으로 거론된다. 말초 조직에서 미토콘드리아 기능 장애가 발생하게 되면 지방산화가 원활히 일어나지 못해 세포 내에 지방이 축적되고 혈중 유리 지방산이 증가하게 된다. 이에 따라 간으로 유입되는 유리 지방산의 양이 증가하면 간 미토콘드리아에서의 지방산화도 증가하게 되면서 산화 과정 중에 발생하는 활성 산소의 생성량도 증가하게 된다. 지방산화 과정 중에 생성된 활성 산소는 지질 과산화를 유발하고 미토콘드리아 DNA 를 손상시켜 미토콘드리아 기능 장애를 악화시키거나 세포 사멸을 유도한다 (Serviddio et al., 2011).

비알콜성 지방간의 치료법

비알콜성 지방간의 병리 기전에 대한 기초 연구 결과들을 바탕으로 비알콜성 지방간의 치료에 이용될 수 있는 타겟 기전이 꾸준히 제시되어 왔다. 이들은 대부분 인슐린 민감성 향상, 혈중 지질 강하, 산화 스트레스 및 염증반응 완화 등을 목적으로 한다 (Anderson et al., 2008). 그러나 약물을 통한 접근은 그 효능과 부작용에 대한 검증이 추가로 더 이루어져야 하므로 아직 뚜렷한 치료법은 확립되어 있지 않은 상태이며, 일반적으로는 생활 습관 개선이 권장된다. 생활 습관 개선 방안에는 신체 활동의 증가, 식이중재 등이 포함되며 이를 통해 적정량의 체중을 감량하는 것을 목표로 한다. 선행 연구들에 따르면, 7-9% 이상의 체중 감량을 한 경우에 유의적으로 간 지방증 및 염증이 개선되었다. 또한, 운동과 영양 교육만 한 경우에 비해 칼로리제한을 통한 식이중재를 함께 실시한 경우에 더 현저한 간 지방증 완화 효과가 관찰되었다. 따라서, 효과적인 체중 감량을 위해서는 이를 도울 수 있는 식이중재 방안의 활용이 필수적이다. 현재 구체적인 식이중재 방안으로서 제안되고 있는 것들로는 칼로리제한, 포화지방 및 트랜스지방 섭취 감소, 다가불 포화 지방산 및 오메가 3 지방산 섭취 증가, 단순당 섭취 감소, 식이섬유 섭취 증가 등이 있으며 최근에는 체중 감량 및 간 지방축적 억제에 효과가 있는 기능성 성분에 대한 연구도 활발하다 (Zelber-Sagi et al., 2011)(Table 1).

Table 1. Therapeutic strategies in the treatment of NAFLD (Anderson, 2008)

Therapeutic Strategy	Prototypic Agent	Putative Mechanism of Action	References
Weight loss	Orlistat	Pancreatic lipase inhibitor; inhibits gastrointestinal fat uptake, reduces lipid overload via reduction of plasma lipids	Zelber-Sagi et al., 2006; Hussein et al., 2007
Insulin sensitizing	Pioglitazone	PPAR γ agonist; redistribution of hepatic lipids to peripheral organs, reduced intrahepatic fat	Bajaj et al., 2004; Promrat et al., 2004; Sanyal et al., 2004; Jung et al., 2005; Belfort et al., 2006; Reynaert et al., 2005; Balas et al., 2007; Lutchman et al., 2007; Merat and Malekzadeh, 2007; Ratzin et al., 2008
Lipid lowering	Atorvastatin	HMG-CoA reductase inhibitor; reduces serum cholesterol, reduces lipid overload via reduction of plasma lipids	Horlander et al., 1997; Kiyici et al., 2003; Hatzitolios et al., 2004; Antonopoulos et al., 2006; Athyros et al., 2006; Gómez-Domínguez et al., 2006
Antioxidant strategies	Vitamin E	ROS scavenger, reduces oxidative stress	Harrison et al., 2003a; Vajro et al., 2004; Loguercio et al., 2007; Yakaryilmaz et al., 2007; Machado et al., 2008
Antiapoptotic strategies	18 β -Glycyrrhetic Acid	Unknown mechanism, prevention of lipotoxic effects (lysosomal and mitochondrial pathways), in vitro and animal models	Wu et al., 2008
Antiinflammatory strategies	Infliximab	TNF- α antibodies; inhibition of TNF- α -mediated activation of leukocytes and effects on other cell types	Li et al., 2003; Barbuio et al., 2007; Koca et al., 2008
Antiplatelet strategies	Ticlopidine	ADP receptor inhibitor, inhibition of platelet aggregation	Fujita et al., 2008
Antifibrotic strategies	Losartan	Inhibition of AT II receptor, reduces stellate cell proliferation and collagen production	Yokohama et al., 2004; Georgescu and Georgescu, 2007
Others	Exenatide	Glucagon-like peptide (GLP-1) analog, stimulation of IR, reduction of intrahepatic fat	Tushuizen et al., 2006
	Dietary <i>n</i> -3 PUFAs	Activation of fatty acid oxidation, reduced De novo lipid synthesis, ROS scavenger, antilipotoxic effects (improvement of hepatic and peripheral insulin resistance)	Sekiya et al., 2003; Capanni et al., 2006; Le Foll et al., 2007; Allard et al., 2008; Machado et al., 2008

2. 비알콜성 지방간의 발생과 관련된 지표

비알콜성 지방간 발생의 임상 지표

지방간의 정확한 확진은 간 생검을 통해 이루어지지만 침습적인 방법이므로 적용이 쉽지 않다는 단점이 있다. 따라서 비교적 쉽게 접근할 수 있는 혈액 시료에서 검출이 가능한 지방간 진단 지표의 발굴에 대한 관심이 높으며, 이에 따라 fetuin-A 에 대한 연구가 최근 활발히 이루어지고 있다.

fetuin-A 는 간에서 주로 합성되어 혈중으로 분비되는 일종의 hepatokine(hepatokine)으로, fetuin-A 의 혈중 농도는 지방간의 심각도와 양의 상관관계를 가진다고 보고되었다 (Stefan et al., 2006). Fetuin-A 녹아웃 (knock-out) 마우스 모델은 야생형 (wild type) 마우스보다 인슐린 민감도가 증가되어 있고, 고지방 식이를 섭취시켰을 때 체중이 잘 증가하지 않았다 (Mathews et al., 2002). 사람을 대상으로 한 연구에서도, 지방간 소견을 보이는 비만 피험자에서 지방간이 없는 비만 피험자에 비해 혈중 fetuin-A 농도가 높았고, 피험자가 체중 감량을 한 경우 혈중 fetuin-A 농도가 감소하고 지방간 증상이 완화되었다 (Reinehr et al., 2008). 이는 fetuin-A 의 혈중 농도가 지방간 발생 여부 및 체중 증감에 민감하게 반응하는 지표임을 시사한다. 그러나 비만 혹은 지방간이 있는 환자에서 혈중 fetuin-A 농도가 증가하는 현상의 분자적 기전은 아직 밝혀져 있지 않은 상태이다.

지방산화 관련 지표

PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor alpha)는 지질리간드에 의한 자극에 반응하여 DNA의 특정 부분에 결합함으로써 유전자 발현을 조절하는 핵 수용체인 PPAR의 한 종류이다. PPAR α 의 활성화는 조직으로의 유리지방산 수용을 촉진하여 미토콘드리아와 퍼옥시좀을 통해 지방산의 산화를 증가시킴으로써 간 지방 축적을 저해하는 효과를 가져온다.

간에서의 지방산화는 주로 베타산화 (β -oxidation) 과정에 의해 매개된다. 베타산화는 미토콘드리아 내부에서 주로 일어나는데, 단쇄 및 중쇄 지방산과 달리 장쇄지방산은 수동확산에 의해 미토콘드리아 내부로 진입할 수 없으므로 미토콘드리아 외막에 존재하는 전이효소인 CPT1A (carnitine palmitoyltransferase 1a)의 작용을 필요로 한다. CPT1A는 지방신생합성 과정의 대사 중간체인 말로닐 CoA (malony-CoA)에 의해 활성이 저해된다. 비만으로 인해 인슐린 저항증이 유발되면 세포 내 말로닐 CoA의 농도가 높아져 CPT1A의 활성이 저해받고 (Rasmussen et al., 2002), 이는 필요한 만큼의 장쇄지방산의 산화가 충분히 일어나지 못하게 함으로써 지방축적을 가속화하는 데 기여하게 된다.

미토콘드리아 내부에서의 베타산화 과정은 일련의 효소들에 의해 수행된다. 그 중 ACADL (long-chain acyl-CoA dehydrogenase)과 HADH α (hydroxylacyl-CoA dehydrogenase alpha subunit)는 베타산화 과정을 조절하는 주요한 속도제한 효소 (rate-limiting enzyme)들이다. 미토콘드리아뿐 아니라 퍼옥시좀에서도

일부 베타산화가 일어나는데, 이 과정을 매개하는 주요 효소는 ACOX1 (acyl-CoA oxidase 1)이다. 고지방 식이의 섭취 및 그에 따른 비만 상태에서는 간 내에 과도한 지방이 존재함으로 인해 그에 따른 지방산화 부담이 증가하게 되며, 이를 줄이기 위해 CYP4A10 (cytochrome P450 family 4 subfamily a polypeptide 10) 등에 의해 마이크로솜 (microsome)에서의 오메가산화 기전이 활성화된다.

간 내 지방산화 활성화는 간 지방축적을 줄이기 위한 주요한 타겟 기전이지만 한편으로는 과도한 지방산화로 인해 유도된 산화 스트레스가 간 손상의 주요한 원인으로 작용할 가능성도 있다. SOD2 (superoxide dismutase 2)는 미토콘드리아 기질에 존재하는 효소로서 미토콘드리아 지방산화의 부산물로 생성되는 초과산화이온 (superoxide)을 그보다 반응성이 덜한 산소와 과산화수소 (hydrogen peroxide)로 전환시키는 효소이다. 과산화수소는 다시 카탈라아제 (catalase)의 작용에 의해 물과 산소로 전환된다. UCP2 (uncoupling protein 2)는 미토콘드리아 내막에 존재하는 단백질로서, 산화적 인산화 과정 중에 양성자 누출 (proton leak)을 유발하여 미토콘드리아 내막을 경계로 형성된 수소이온 농도구배를 완화시키는 역할을 한다. 즉, 수소이온 농도구배로 인해 형성된 막전위가 ATP 합성으로 이어지지 못하게 함으로써 낭비적 대사를 유발하며, 나아가 활성산소종 (reactive oxygen species)의 생성을 줄이고 산화 스트레스로부터 세포를 보호하는 기능을 한다 (Diano et al., 2012).

지방합성 관련 지표

PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma)는 앞서 언급한 PPAR α 와 같이 지질 리간드에 반응하는 핵 수용체인 PPAR 의 또 다른 종류 이며, 지방 조직에서 주로 발현된다. PPAR γ 는 지방세포가 분화하는 데 핵심적인 작용을 하며 세포의 지질 수용 및 저장 능력을 증진시키는 방향으로 타겟 유전자의 발현을 조절한다 (Evans et al., 2004). PPAR γ 는 간에서는 거의 발현되지 않지만, 지방간 환자의 경우 간에서 mRNA 수준이 증가한다는 보고가 있다 (Pettinelli et al., 2011).

CD36 (cluster of differentiation 36)는 장쇄 지방산의 세포 내 유입을 촉진하여 지질흡수의 초기 단계를 조절하는 역할을 담당한다 (He et al., 2011). 소장에서는 흡수된 지방산이 킬로미크론 (chylomicron)으로 형성되는 과정에도 중요하게 관여한다 (Abumrad et al., 2012). FABP (fatty acid binding protein)는 지방산 및 아이코사노이드 (eicosanodis)를 비롯한 지질에 가역적으로 결합하는 단백질로서, 아홉가지 종류가 있으며 간에서 주로 발현되는 형태는 FABP1 이다. FABP 는 세포질에 존재하면서 세포막을 통과하여 세포 내로 유입된 지용성 물질들을 핵 수용체로 전달하여 결과적으로 지질 대사 및 염증 반응과 관련된 유전자의 전사에 관여하는 리간드의 이용성을 조절한다. FABP1 녹아웃 마우스는 공복 상태에서 간으로의 유리지방산 유입이 감소되어 야생형 쥐보다 중성지방 축적이 현저하게 적었으며, 고지방 식이 섭취 시 비만 유도에 저항성을 나타냈다는 보고가 있다 (Makowski et al., 2005).

SREBF1 (sterol regulatory element-binding transcription factor 1)은 인슐린에 의해 발현이 유도되며, 전구체 형태로 합성되어 소포체 (endoplasmic reticulum) 막에 존재하다가 활성화되면 핵 내로 이동하여 지방신생합성 및 탄수화물 대사에 관여하는 유전자의 발현을 촉진한다. 말로닐 CoA로부터 palmitic acid (16:0)를 생성하는 FASN (fatty acid synthase)이 SREBF1의 대표적인 타겟 유전자이다. SLC25A1 (solute carrier family 25 member 1)은 미토콘드리아 내부에서 TCA 회로가 진행됨에 따라 생성되는 중간 대사 산물인 구연산 (citrate)을 세포 기질로 운반하는 효소로, SREBF1의 또 다른 타겟 유전자이다. 미토콘드리아로부터 세포 기질로 운반된 구연산은 아세틸 CoA (acetyl-CoA)로 전환되어 지방신생합성 과정에 이용된다 (Shimano, 2001).

3. 잣기름의 특성 및 구성 성분

현재 전 세계적으로 식용으로 사용되는 잣은 *Pinus koraiensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus pinea*, *Pinus sibirica*, *Pinus monophylla* 등의 품종으로부터 수확된다. 이 중 우리나라에서 생산되는 품종은 *Pinus koraiensis*이며 (Wolff et al., 1995), 우리나라 외에도 중국, 일본 등지에 분포되어 있다. 잣은 예부터 과자류, 식혜 등의 한국 고유 식품에 사용되어 왔을 뿐 아니라, 당뇨병, 중풍, 진통, 천식, 폐결핵 등에 약용으로 쓰이기도 했다 (Yoon, 1987).

식품성분표 (2011)에 따르면 잣의 일반 성분 조성은 지방 61.5%, 탄수화물 17.6%, 단백질 15.4%, 수분 3.5%, 회분 2%로 다량의 지방질을 함유하고 있음을 알 수 있다. 따라서, 지금까지 잣 성분에 대한 대부분의 연구도 주성분인 지방질에 대하여 이루어져 왔다.

한국산 잣기름은 palmitic acid 4%, oleic acid (18:1, Δ^9) 28%, linoleic acid (18:2, $\Delta^9,12$) 47%, pinolenic acid 14%를 포함하는 것으로 보고되었다. 이 중 pinolenic acid 는 Δ^5 -UPIFA (Δ^5 -unsaturated polymethylene-interrupted fatty acids)의 하나로, 침엽수의 잎 또는 종실로부터 얻은 지질에 특이적으로 존재하는 지방산이다 (Lee et al., 2004; Wolff et al., 2000). Pinolenic acid 는 탄소 18 개로 이루어진 장쇄 지방산의 하나로 5, 9, 12 번 탄소 위치에 총 3 개의 불포화 결합을 포함하며 γ -linolenic acid (18:3 $\Delta^6,9,12$)와 α -linolenic acid (18:3

$\angle 9,12,15$)의 위치 이성질체이기도 하다 (Figure 2).

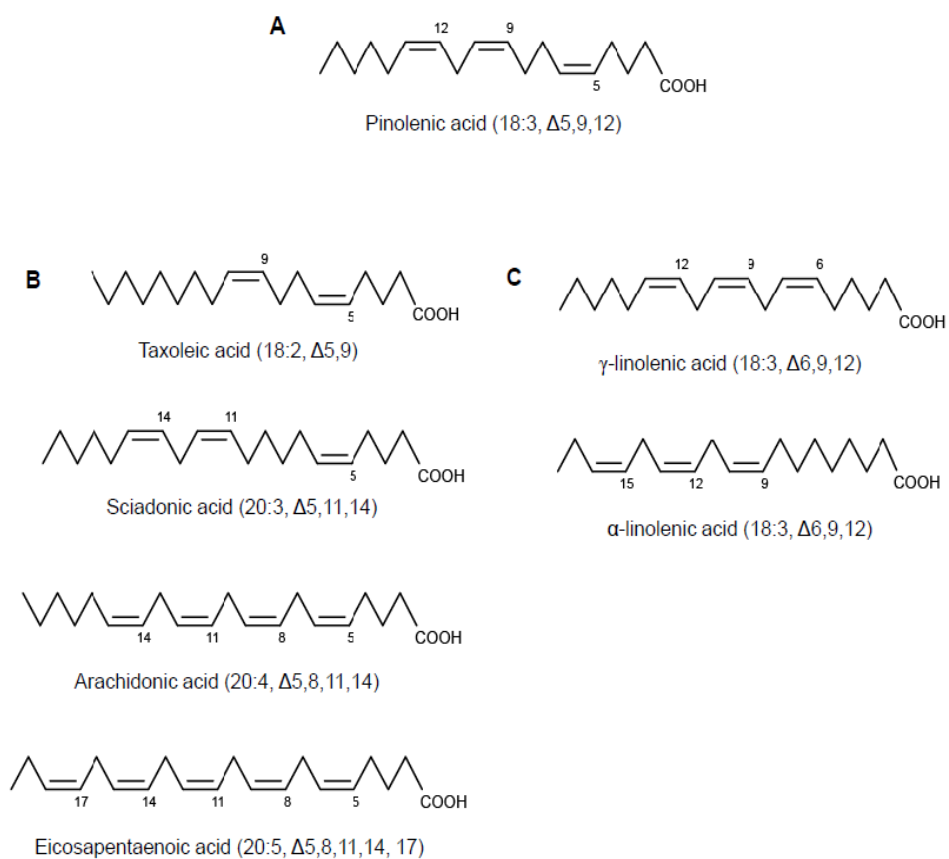


Figure 2. Structures of pinolenic acid, Δ 5-unsaturated fatty acids, and positional isomers of pinolenic acid (A) pinolenic acid, (B) Δ 5-unsaturated polymethylene- and methylene-interrupted fatty acids, (C) positional isomers of pinolenic acid.

4. 잣기름의 효능

잣기름의 식욕 조절 효과

한국산 잣기름에서 추출한 지방산을 마우스의 장 분비 세포인 STC-I 에 처리하였을 때, 대조 시료들에 비해 CCK (cholecystokinin)-8 의 분비를 현저히 증가시켰다는 실험 결과가 보고되었다 (Pasman et al., 2008). 이 실험의 대조 시료로서 단일지방산은 oleic acid, linoleic acid, α -linolenic acid, capric acid (10:0)이, 복합 지방산은 지중해산 잣기름에서 추출한 지방산이 사용되었다. 한국산 잣기름에는 14% 가량의 pinolenic acid 이 포함되어 있는 반면, 지중해산 잣기름에는 pinolenic acid 가 1% 밖에 포함되어 있지 않다. 따라서 장 분비 세포의 CCK-8 분비에 영향을 미치는 성분은 pinolenic acid 일 가능성이 높다. 과체중 여성을 대상으로 한 또 다른 연구에서도, 한국산 잣기름의 지방산 2g 을 식사 전에 캡슐의 형태로 제공하였을 때 올리브기름 캡슐을 제공하였을 때보다 식사 섭취량을 9% 낮추는 것으로 나타났다 (Hughes et al., 2008). 그러나 잣기름의 식욕 조절 효과에 관한 가장 최근의 연구에서는 (Verhoef et al., 2011), 피험자들에게 잣기름의 중성지방 (triacylglycerol) 6g 를 포함하는 요거트를 섭취하도록 하고 유지방 6g 을 포함한 요거트를 섭취한 경우에 비해 적은 식사량을 보이는지 검증하고자 하였으나 두 군 간의 유의적인 차이를 관찰하지는 못했다. 선행 연구들 간에 이러한 차이가 나타나는 것은 실험에 적용한

잣기름의 공급 형태, 대조 시료로 사용한 지질의 종류, 식사 섭취량 측정 시기 등이 달랐기 때문인 것으로 보이며, 여전히 천연 식욕 조절 물질로서 잣기름의 역할에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

잣기름의 혈중 지질 강하 효과

잣기름이 혈중 지질 프로파일에 미치는 영향에 대한 연구는 프랑스 Jean Dallongeville 의 연구팀에 의해 주로 수행되었다. 이들에 의해 수행된 연구는 주로 프랑스 남서부 지방에 자생하는 해안송 (maritime pine, *Pinus pinaster*) 으로부터 생산된 잣기름을 대상으로 한다. 프랑스산 잣기름의 지방산 조성은 한국산 잣기름과 비교했을 때 Δ^5 -UPIFA 조성에서 약간의 차이를 보인다. 한국산 잣기름은 Δ^5 -UPIFA 중 pinolenic acid 를 15%로 가장 많은 양 포함하고 있고 다른 Δ^5 -UPIFA 의 포함 정도는 미미한 반면, 프랑스산 잣기름은 7%의 pinolenic acid 와 7%의 sciadonic acid (C20:3, $\Delta^5,11,14$)를 포함하고 있다 (Asset et al., 1999b). 프랑스산 잣기름은 라아드 및 해바라기씨 기름과 비교했을 때 apo E 결핍 마우스에서 혈중 총 콜레스테롤 및 VLDL 콜레스테롤 농도는 낮춘 반면, 혈중 총 중성지방 및 VLDL 중성지방 농도는 오히려 높였다고 보고되었다 (Asset et al., 1999a). 또한 사람의 apo A-I 또는 apo B 를 발현하는 마우스 모델에서, 각각 라아드와 코코넛기름에 비해 잣기름이 LDL (low-density lipoprotein)과 HDL (high-density lipoprotein) 콜레스테롤 수준을 모두 저하시키는

것으로 나타났다 (Asset et al., 2001; Asset et al., 2000). 이 연구 결과들은 잣기름이 전반적으로 혈중 콜레스테롤 수치를 저하시키는 기능을 한다는 점을 시사하지만, 한편으로는 HDL 콜레스테롤 농도도 저하되었다는 결과가 있으므로 잣기름의 섭취가 혈중 지질 프로파일을 개선할 수 있다는 결론에는 도달하지 못하였다.

잣기름의 체중 증가 억제 및 지방간 예방 효과

마우스 모델에 잣기름을 섭취시켰을 때, 옥수수기름을 섭취시켰을 때보다 체중이 적게 증가하는 현상이 관찰되었다 (Ferramosca et al., 2008b). 이 연구에서 잣기름은 옥수수기름에 비해 식이 섭취량을 유의적으로 낮추지 않았으므로 결과적으로 잣기름이 옥수수기름에 비해 낮은 식이 효율을 보였다. 같은 연구팀에 의해 잣기름이 CLA (conjugated linoleic acid)에 의해 유도된 지방간을 완화할 수 있는지에 대한 연구가 수행되었다 (Ferramosca et al., 2008a). CLA 보충은 전체적인 체지방 축적을 낮추는 효과가 있는 반면, 간에서 인슐린 저항증 및 지방축적이 나타난다는 점이 부작용으로 지적되어 왔다. 이 연구에서는 일반 식이에 각각 올리브기름, 올리브기름과 CLA, 잣기름과 CLA 를 보충한 3 가지 식이군을 설정하였다. 잣기름과 CLA 를 함께 보충한 군은 CLA 의 체지방 축적 억제 효과를 그대로 유지하면서 나머지 두 군에 비해 간 중성지방 및 콜레스테롤 축적이 유의적으로 적은 효과를 나타냈다. CLA 보충에 따른 고인슐린 혈중도 완화된 양상을 보였다. 잣기름과

CLA 를 보충한 군에서는 올리브기름과 CLA 를 보충한 군보다 간에서의 *Slc25a1* mRNA 수준 및 ACC (acetyl-CoA carboxylase)와 FASN 의 효소 활성이 유의적으로 낮아, 지방신생합성 과정이 상대적으로 저해되어 있음이 확인되었다.

Ⅲ. 연구 방법

1. 실험 설계 및 실험 동물 사육

5 주령 수컷 C57BL/6 마우스 88 마리를 (주) 중앙 실험 동물 (Seoul, Korea)에서 구입하여 서울대학교 수의과대학 실험 동물 시설의 SPF (specific pathogen-free) room 에서 사육하였다. 실험 동물은 3 일간의 적응 기간을 거친 후, 군당 평균 체중이 유사하도록 10~12 마리씩 8 군에 임의 배정하였다. 실험 설계 및 사육 과정은 **Figure 3**에 개략적으로 나타내었다. 실험 동물은 한 케이지 당 한 마리씩 분리하여 사육하였으며 사육 기간 동안 사육실의 환경은 온도 $23 \pm 3^{\circ} \text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$, 명암 12 시간 주기로 유지되었다. 체중은 1 주일에 1 회, 식이 섭취량은 1 주일에 4 회 측정하였다. 12 주간의 실험 식이 기간이 끝난 후에 실험 동물을 12 시간 금식시키고 CO_2 과다 흡입 방법을 이용하여 안락사시켰다. 동물 실험의 모든 과정은 서울대학교 동물 실험 윤리위원회 (Seoul National University Institutional Animal Care and Use Committee; SNU IACUC)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다 (승인번호: SNU-101029-1).

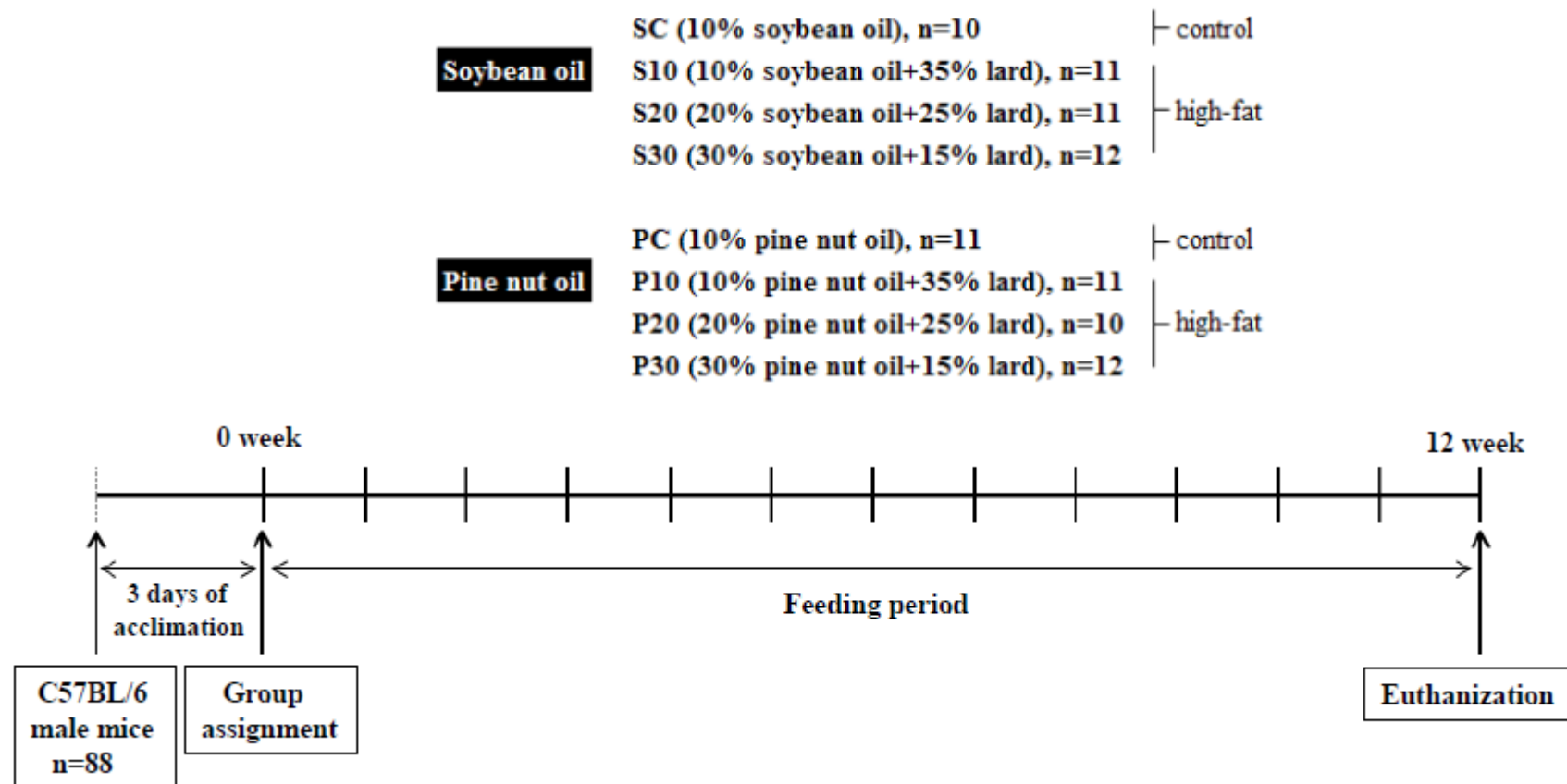


Figure 3. The experimental design

2. 실험 식이

실험 식이는 AIN-76A 정제 식이 조성을 바탕으로 하여 지방 공급원의 종류, 고지방 식이 여부, 고지방 식이에서의 콩기름 및 잣기름 대체 정도에 따라 총 8 종류의 실험식이를 펠렛 형태로 주문 제작하였다 (Dyets, PA, USA). 잣기름은 DubioCo., Ltd. (GyeongGi-do, Korea)에서 제공받았다. 실험 식이의 전체 조성은 **Table 2**에 나타내었다. 일반 식이는 전체 칼로리 중 10%를 지방으로 공급하며, 지방의 공급원은 콩기름 (SC) 또는 잣기름 (PC)으로 달리하였다. 고지방 식이는 전체 칼로리 중 45%를 지방으로부터 공급하며, 이 중 10% (S10, P10), 20% (S20, P20), 30% (S30, P30)를 콩기름 또는 잣기름으로 대체하고 나머지는 라아드로 공급하였다. 잣기름 특이적인 효과는 pinolenic acid에 기인할 가능성이 높으므로 pinolenic acid를 제외한 다른 지방산 조성이 잣기름과 가장 유사한 콩기름을 대조 시료로 선정하였다. 실험 식이의 지방산 조성을 분석한 결과는 **Table 3**에 나타내었다. 실험 식이는 실험 동물에게 제공되기 전까지 4° C에서 보관하였으며 실험 식이와 멸균된 3차 탈이온수는 모두 자유 급여 (ad libitum)하였다.

Table 2. Composition of the experimental diets (g)^a

	Control diet	High-fat diet		
	10% Oil	10% Oil +35% Lard	20% Oil +25% Lard	30% Oil +15% Lard
Casein	200	200	200	200
L-Cystine	3	3	3	3
Sucrose	350	172.8	172.8	172.8
Cornstarch	315	72.8	72.8	72.8
Dyetrose	35	100	100	100
PNO ^b or SBO	45	45	90	135
Lard	0	157.5	112.5	37.5
t-Butylhydroquinone	0.009	0.009	0.018	0.027
Cellulose	50	50	50	50
Mineral mix ^c	35	35	35	35
Vitamin mix ^d	10	10	10	10
Choline bitartrate	2	2	2	2
Total	1045	848.1	848.1	848.1
kcal/g diet	3.7	4.6	4.6	4.6

^aResource: Dyets, Inc, Bethlehem, PA, USA.

^bPNO was a gift from DubioCo., Ltd. (GyeongGi-do, Korea)

^cThirty-five grams of mineral mix (Dyets, #210099) provides 5.1 g calcium, 4 g phosphorus, 3.6 g potassium, 1 g sodium, 1.6 g chloride, 0.5 g magnesium, 0.3 g sulfur, 59 mg manganese, 46 mg iron, 25 mg zinc, 5 mg copper, 0.2 mg selenium, 0.2 mg iodine and 4.2 g sucrose.

^dTen grams of vitamin mix (Dyets, #300050) provides 4000 IU vitamin A, 1000 IU vitamin D₃, 50 IU vitamin E, 30 mg niacin, 16 mg pantothenic acid, 7 mg vitamin B₆, 6 mg vitamin B₁, 6 mg vitamin B₂, 2 mg folic acid, 0.8 mg menadione, 0.2 mg biotin, 10 µg vitamin B₁₂ and 9.8 g sucrose.

Table 3. Fatty acid composition of experimental diets (% of fat)

	Soybean oil diet				Pine nut oil diet			
	Control diet	High-fat diet			Control diet	High-fat diet		
	SC	S10	S20	S30	PC	P10	P20	P30
Myristic acid (C14:0)	.	0.9	0.7	0.4	.	0.9	0.7	0.4
Palmitic acid (C16:0)	11.9	18.9	16.4	14.0	7.0	17.8	14.5	10.5
Stearic acid (C18:0)	4.8	11.1	8.8	6.9	3.6	10.7	8.5	6.2
Total SFA	16.7	30.9	25.9	21.3	10.6	29.4	23.7	17.1
Palmitoleic acid (C16:1 Δ 9)	.	1.4	1.0	0.6	.	1.4	1.3	0.7
Oleic acid (C18:1 Δ 9)	21.1	34.7	31.3	27.7	27.4	36.0	33.5	31.7
Total MUFA	21.1	36.1	32.3	28.3	27.4	37.4	34.8	32.4
Linoleic acid (C18:2 Δ 9,12)	54.9	30.3	37.7	44.9	47.2	28.6	34.0	39.7
α -linolenic acid (C18:3 Δ 9,12,15)	7.4	2.8	4.2	5.5	0.8	1.3	1.1	1.0
Pinolenic acid (C18:3 Δ 5,9,12)	14.0	3.3	6.5	9.7
Total PUFA	62.3	33.1	41.9	50.4	62	33.2	41.6	50.4

3. 시료 채취

3.1 혈액

실험 동물을 안락사한 직후에 심장 채혈을 통해 약 1 mL 의 혈액을 얻었다. 1.5 mL 튜브에 혈액을 받아 상온에서 2 시간 정치한 후 2000 rpm, 4° C 조건에서 20 분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -80° C 에서 보관하였다.

3.2 조직

간은 적출 후 쓸개를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 세척한 후 무게를 측정하였다. 지방 조직은 부고환, 신장 및 후복강, 피하에 부착되어 있는 지방을 분리하였으며 마찬가지로 PBS 용액으로 세척하였다. 조직은 분석 전까지 -80° C 에서 보관하였다.

4. 실험 방법

4.1. 실험 식이로부터 지질 추출 및 지방산 조성 측정

Folch 방법을 응용하여 식이로부터 지질을 추출하였다 (Folch et al., 1957). 펠렛 형태의 식이를 빵아 가루 형태로 만든 시료 50 mg 을 튜브에 넣고 클로로포름 1 mL와 메탄올 0.5 mL을 첨가한 후 상온에서 약 16 시간 동안 교반하였다. 2000 rpm, 10 분 조건에서 원심분리한 후, 상층액 1 mL을 취해 새 튜브로 옮겼다. 0.9% 염화나트륨 수용액 (0.9% NaCl) 0.2 mL을 첨가하고 약 30 분 동안 교반하였다. 2000 rpm, 10 분 조건에서 원심분리한 후, 나뉜 하층액 0.5 mL을 취해 새 튜브로 옮기고 질소 가스로 용매를 말렸다.

위 과정을 통해 추출된 지질 시료를 메틸화하여 지방산 메틸에스터 (FAME; fatty acid methyl ester)를 생성하였다. 남은 펠렛에 0.5 N 메탄올성 수산화 나트륨 용액 (0.5 N NaOH in methanol) 0.4 mL을 첨가하고, 100° C에서 5 분 동안 인큐베이션 하였다. 흐르는 물에 튜브를 완전히 식힌 후 14% 메탄올성 삼불화붕소 용액 (14% BF₃ in methanol) 0.4 mL을 첨가하고 다시 100° C에서 5 분 동안 인큐베이션 하였다. 흐르는 물에 튜브를 완전히 식힌 후 헥산 (hexane) 0.5 mL과 물 8.5 mL을 첨가한 후 10 분 동안 상온에서 교반하였다. 1000 rpm, 상온 조건에서 5 분 동안 원심 분리하고, 원심분리 후 분리된 상층액을 가스 크로마토그래피 용 용기에 옮겼다.

위 과정을 통해 준비된 시료 1 μL 를 split ratio 1:10 조건으로 가스 크로마토그래피 기기 (Agilent 7890A; Agilent, CA, USA)에 주입하여 지방산 조성을 분석하였다. 컬럼은 DB-Carbowax (0.32 mm \times 25 m, 0.2 μm) (Agilent), 검출기는 불꽃이온화검출기 (flame ionization detector)를 이용하였다. 오븐 온도는 50° C에서 시작하여 분당 15° C 속도로 220° C까지 승온 후, 20 분 동안 유지하였다. 운반 가스는 헬륨을 이용하였으며 분당 1.5 mL 속도로 유지하였다. 산출된 각 지방산 피크는 표준 시료의 머무름 시간 (retention time)과 비교하여 정성하였고, 시료 중에 포함된 각 지방산의 비율은 전체 피크 면적에 대한 해당 피크의 면적비 퍼센트를 바탕으로 계산하였다.

4.2 혈청 지질 농도 측정

혈청 중성지방 측정을 위해서는 아산셋트 중성지방 측정용 시액 Cleantech TG-S 키트(Asan pharmaceutical, Korea)를 이용하였다. 효소 반응을 이용하여 중성 지방을 글리세롤과 지방산으로 분해하고, 생성된 글리세롤을 소거하는 과정에서 발생하는 과산화수소를 키노이드 색소로 전환하여 비색 정량하는 방법이다. 96-well plate 의 각 well 에 혈청 시료와 표준 시료를 2 μL 씩 분주한 후 효소시약을 300 μL 씩 추가로 분주하고 37° C 에서 10 분 반응시킨 후 550 nm 파장에서 분광광도계 (Spectramax 190; Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준 시료의 흡광도로부터 도출된 표준 곡선을 바

탕으로 혈청 시료의 중성지방 농도를 계산하였다.

혈청 총 콜레스테롤 측정을 위해서는 아산셋트 총 콜레스테롤 측정용 시약 T-CHO 키트 (Asan pharmaceutical)를 사용하였다. 효소 반응을 이용하여 콜레스테롤 에스테르를 분해하여 콜레스테롤을 유리시키고, 이 과정에서 생성된 과산화수소를 적색의 키논형 색소로 전환하여 비색 정량하는 방법이다. 96-well plate의 각 well에 혈청 시료와 표준 시료를 2 μ L씩 분주한 후 효소시약 300을 μ L씩 추가로 분주하고 37°C에서 5 분 동안 반응시킨 후, 500 nm 파장에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준 시료의 흡광도로부터 도출된 표준 곡선을 바탕으로 혈청 시료의 총 콜레스테롤 농도를 계산하였다.

혈청 유리지방산 측정에는 SICDIA NEFAZYME 키트 (Shin Yang Chemical, Busan)를 사용하였다. 효소 반응을 통해 유리지방산으로부터 아실 조효소 A (acyl coenzyme A)를 생성하고 생성된 아실 조효소 A 를 다시 산화시키는 과정에서 발생하는 과산화수소를 자색의 키논 색소로 전환시켜 비색 정량하는 방법이다. 96-well plate 의 각 well 에 혈청 시료와 표준 시료를 4 μ L 씩 분주한 후, NEFA 시약 1 을 200 μ L 씩 추가로 분주하고 38° C 에서 5 분 반응시켰다. 이 후, 다시 NEFA 시약 2 를 각 well 에 100 μ L 씩 분주하고 38° C 에서 반응시킨 후 546 nm 파장에서 분광광도계(Spectramax 190)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준 시료의 흡광도로부터 도출된 표준 곡선을 바탕으로 혈청 시료의 유리지방산 농도를 계산하였다.

4.3 혈청 leptin 농도 측정

혈청 leptin 농도는 Quantikine[®] Mouse Leptin kit (R&D Systems, MN, USA)을 이용하여 측정하였다. 마우스 leptin 에 특이적인 항체가 코팅된 96-well plate 의 각 well 에 표준 시료 및 20 배 희석한 혈청 50 μ L 와 희석액 50 μ L 를 분주한 후 상온에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 2 시간이 지난 후 well 을 비우고 wash buffer 로 well 을 5 회 세척하였다. 이 후, HRP (horseradish peroxidase)가 결합되어 있는 마우스 leptin 특이적인 항체 용액을 100 μ L 씩 각 well 에 분주하고 다시 상온에서 2 시간 동안 인큐베이션 하였다. 2 시간이 지난 후, well 을 비우고 wash buffer 로 5 회 세척한 후, HRP 의 기질 용액을 100 μ L 씩 각 well 에 분주하였다. 상온에서 30 분 동안 인큐베이션한 후 염산 용액을 100 μ L 씩 분주하여 반응을 종결시켰다. 반응이 종결된 후 30 분 이내에 주파장 450 nm, 부파장 570 nm 에서 분광광도계(Spectramax 190)를 이용하여 흡광도를 측정하고, 표준 시료로부터 도출된 표준 곡선을 바탕으로 시료의 leptin 농도를 계산하였다.

4.4 혈청 fetuin-A 농도 측정

혈청 fetuin-A 농도는 mouse Fetuin-A/AHSG DuoSet (R&D systems)을 이용하여 측정하였다. 96-well plate 의 각 well 에 마우스 fetuin-A 에 특이적인 항체 용액을 100 μ L 씩 분주하고 상온에서 약 16 시간 동안 인큐베이션 하였다. 각 well 을 비운 후 wash buffer 로 3

회 세척하고 희석액을 300 μ L 씩 분주하였다. 상온에서 1 시간 동안 인큐베이션 하고, well 을 비운 후 다시 wash buffer 로 3 회 세척하였다. 표준 시료 및 5000 배 희석한 혈청을 100 μ L 씩 각 well 에 분주하고 상온에서 2 시간 인큐베이션 하였다. 이 후, well 을 비우고 wash buffer 로 3 회 세척하고 HRP 가 결합되어 있는 마우스 fetuin-A 에 특이적인 항체 용액을 100 μ L 씩 분주하였다. 상온에서 2 시간 동안 인큐베이션 한 후, well 을 비우고 wash buffer 로 3 회 세척하였다. 각 well 에 HRP 의 기질 용액을 100 μ L 씩 분주하고 상온에서 20 분 동안 인큐베이션 한 후, 황산 용액을 50 μ L 씩 분주하여 반응을 종결시켰다. 반응이 종결된 후 30 분 이내에 주파장 450 nm, 부파장 570 nm 에서 분광광도계 (Spectramax 190)를 이용하여 흡광도를 측정하고, 표준 시료로부터 도출된 표준 곡선을 바탕으로 시료의 fetuin-A 농도를 계산하였다.

4.5 간 지질 농도 측정

Folch 방법을 응용하여 간 조직으로부터 지질을 추출하였다 (Folch et al., 1957). 2 mL 튜브에 60 μ L PBS 용액과 25 mg 의 간 조직을 넣고 균질화하였다. 균질화한 용액에 클로로포름 800 μ L 와 메탄올 400 μ L 을 첨가한 후 상온에서 약 16 시간 동안 인큐베이션하였다. 2000 rpm, 10 분, 상온 조건에서 원심분리한 후 분리된 하층액을 취해 새 튜브로 옮겨 담았다. 튜브의 뚜껑을 연 상태에서 후드에서 약 3

시간 동안 방치하여 용매를 날려보낸 후 이소프로판올 0.1 mL 에 충분히 녹였다. 간에서 추출된 지질로부터의 중성지방과 콜레스테롤 측정은 4.1 에서와 같은 방법으로 수행되었다.

4.6 총 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR

2 mL 튜브에 간 조직 50 mg 과 TRIzol (Life technologies co., CA)용액 1 mL 을 넣고 균질화하였다. 균질화한 용액을 1.5 mL 튜브에 옮겨 담은 후 상온에서 5 분 동안 인큐베이션 하고 클로로포름 200 μ L 를 첨가하였다. 상온에서 3 분 동안 인큐베이션 한 후 12000 g, 4° C 조건에서 15 분 동안 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 취하여 새 튜브에 옮겨 담고 이소프로판올 500 μ L 을 첨가하였다. 상온에서 10 분 간 인큐베이션 한 후 12000 g, 4° C 조건에서 10 분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 튜브 바닥에 남은 펠렛에 75% 에탄올 1 mL 을 분주하고 펠렛이 떨어질 때까지 흔든 후 7500 g, 4° C 조건에서 2 분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 버린 후 튜브 뚜껑을 열고 거꾸로 비스듬하게 세운 채로 10 분 동안 방치하여 펠렛의 물기를 제거하였다. 0.2% DEPC 를 첨가한 3 차 증류수 20 μ L 로 펠렛을 녹인 후 분광광도계 DU530 (BECKMAN, CA, USA)를 이용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 측정하였다.

PrimeScriptTM II 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc., Japan)을 사용하여 추출한 총 RNA 로부터 cDNA 를 합성하였다.

RNA 시료 2 μ g, oligo dT primer (50 μ M) 1 μ L, dNTP mixture (10 μ M) 1 μ L, RNase-free dH₂O 3 μ L 를 혼합하여 65° C 에서 5 분 동안 인큐베이션 한 후, 얼음에 옮겨 식혔다. 이 후 PrimeScript™ II buffer (5 \times) 4 μ L, RNase inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, PrimeScript™ II RTase (200 U/ μ L) 1 μ L, RNase-free dH₂O 4.5 μ L 를 첨가하여 최종 부피를 20 μ L 로 맞춘 후 Applied Biosystems Thermal Cycler 2720 (Life technologies co., CA, USA)에서 42° C 에서 50 분, 95° C 에서 5 분 동안 차례로 반응시켰다. 합성된 cDNA 는 분석 전까지 -20° C 에서 보관하였다.

합성된 cDNA 를 주형으로 각 유전자에 특이적인 primer 를 이용하여 real-time PCR 을 수행하였다. 합성된 cDNA 2-5 ng 와 forward, reverse primer 각 0.4 μ L, ROX dye (50 \times) 0.4 μ L, SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 10 μ L, 3 차 증류수 7.8 μ L 를 혼합하여 총 20 μ L 부피로 맞춘 후 Applied Biosystems StepOne Real-time PCR system (Life technologies co.)에서 반응시켰다. 분석에 사용한 primer 의 염기 서열은 **Table 4** 에 나타내었다. 95° C 에서 30 초 동안 초기 반응시킨 후, 95° C 에서 5 초간 변성 (denaturation), 60° C 에서 30 초간 결합 (annealing) 및 신장 (extension) 과정을 40 회 반복 시행하였다. 이 후 95° C 에서 15 초, 60° C 에서 1 분, 95° C 에서 15 초간 차례로 반응시켜 용해 곡선 (melt curve)을 얻었다. 각 유전자의 발현량은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 통해 계산하여 군 별로 상대정량 하였으며, 하

우스키핑 유전자인 *Gapdh* 의 발현량으로 보정하였다.

Table 4. Primer sequences used in real-time quantitative PCR

Gene	Function	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')
<i>Ahsg/fetuin-A</i>	fatty liver indicator	TTGCTCAGCTCTGGGGCT	GGCAAGTGGTCTCCAGTGTG
<i>Ppara</i>	transcription factor	GCAGTGGAAGAATCGGACCT	CAACCCGCCTTTTGTGCATAC
<i>Cpt1a</i>	mitochondrial β -oxidation	GATGTTCTTCGTCTGGCTTGA	CTTATCGTGGTGGTGGGTGT
<i>Acadl</i>	mitochondrial β -oxidation	TCGCAATATAGGGCATGACA	ACTTGGAAGAGCAAGCGTA
<i>Hadha</i>	mitochondrial β -oxidation	CCCTTTGAACACTTGCTGCT	GCCCAGGTCTCTGTGGATAA
<i>Acox1</i>	peroxisomal β -oxidation	GTCAAAGGCATCCACCAAAG	GAGGGGAACATCATCACAGG
<i>Cyp4a10</i>	microsomal ω -oxidation	CAGAAAGGAGGGAAGATGGAG	CATGGTCTCCAAAATCCAAGG
<i>Sod2</i>	anti-oxidative defense	TTAGAGCAGGCAGCAATCTGT	GCGTGACTTTGGGTCTTTTG
<i>Ucp2</i>	anti-oxidative defense	CAGGTCACTGTGCCCTTACCA	CACTACGTTCCAGGATCCCAA
<i>Pparg</i>	adipogenesis	CAGCAGGTTGTCTTGGATGTC	AGCCCTTTGGTGACTTTATGG
<i>Srebf1</i>	de novo lipogenesis	GTCTCCACCACTTCGGGTTT	CGACTACATCCGCTTCTTGC

<i>Fasn</i>	de novo lipogenesis	GCGGTGTGAAAACGAACTTT	CTGTCTGGGCATAACGGTCT
<i>Slc25a1</i>	de novo lipogenesis	TTCCCTTTAGCCCTTGTTC	TGACCAGACTTCCTCCAACC
<i>Fabp1</i>	fatty acid transport	GAACTCATTGCGGACCACTT	CATCCAGAAAGGGAAGGACAT
<i>Cd36</i>	fatty acid transport	CCAAGCTATTGCGACATGATT	TCTCAATGTCCGAGACTTTTCA
<i>Gapdh</i>	endogenous control	GGAGAAACCTGCCAAGTA	AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG

Ahsg/fetuin-A, alpha-2-HS-glycoprotein; *Ppara*, peroxisome proliferator activated receptor alpha; *Cpt1a*, carnitine palmitoyltransferase 1a; *Acadl*, long-chain acyl-CoA dehydrogenase; *Acox1*, acyl-CoA oxidase 1; *Cyp4a10*, cytochrome P450 family 4 subfamily a polypeptide 10; *Hadha*, hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha subunit; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Ucp2*, uncoupling protein 2; *Pparg*, peroxisome proliferator activated receptor gamma; *Srebf1*, sterol regulatory element-binding transcription factor 1; *Fasn*, fatty acid synthase; *Slc25a1*, solute carrier family 25 member 1; *Fabp1*, fatty acid binding protein 1; *Cd36*, cluster of differentiation 36; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

4.7 총 단백질 추출 및 western blot

2 mL 튜브에 부고환 지방 조직 500 mg 과 RIPA 용액 500 μ L 을 넣고 균질화하였다. 사용한 RIPA 용액의 조성은 다음과 같다: 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail 1tablet/10 mL (Roche). 균질화 과정은 10 초씩 3 회에 걸쳐 이루어졌으며 튜브는 3 회의 균질화 과정 사이에 1 분 이상 얼음에 보관되었다. 이 후 얼음에서 30 분 동안 인큐베이션한 후, 12000 g, 4° C 조건에서 20 분 동안 원심분리 하였다. 단백질 용액 층을 취하여 새 튜브로 옮긴 후 Bradford 방법으로 단백질 농도를 정량 하였다. 96-well plate 에 BSA 표준 시료와 간 조직에서 추출한 단백질 시료를 각 well 에 5 μ L 씩 분주한 후, 5 배 희석하여 준비한 Bradford assay reagent (Bio-rad, CA, USA)를 200 μ L 씩 첨가하였다. 상온에서 3 분 동안 반응시킨 후, 분광광도계 (Spectramax 190)를 이용하여 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 시료로부터 도출된 표준 곡선을 바탕으로 시료의 단백질 농도를 계산하였다. 추출된 단백질 용액은 분석 전까지 -80° C 에서 보관하였다.

특정 단백질의 발현량 측정은 western blot 을 통해 수행되었다. β -mercaptoethanol 이 5% 부피비로 포함된 2 \times sample buffer

(Bio-rad), 단백질 시료, 3 차 증류수를 혼합하여 50 μ g protein/25 μ L 농도로 만든 후 100° C 에서 5 분 인큐베이션하여 시료를 제조하였다. 제조한 시료를 각 well 에 25 μ L 씩 분주한 후 10% SDS-PAGE 시스템에서 50 V 에서 15 분, 100 V 에서 90 분 조건으로 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 PVDF 멤브레인에 50 V 에서 90 분 조건으로 전이시켰다. 전이가 완료된 후 ponceau S 용액으로 염색하여 PVDF 멤브레인 상의 밴드를 확인하고 3% BSA 용액으로 1 시간 동안 차단(blocking)하였다. 이 후, 3% BSA 용액에 1000 배 희석한 anti-mouse SIRT3 항체 (Cell signaling technology, MA, USA)를 4° C 에서 16 시간 반응시켰다. 반응시킨 멤브레인을 TBST 용액 (0.1% Tween-20 in TBS)으로 10 분씩 3 회 세척한 후 HRP 가 결합된 2 차 항체 anti-mouse IgG 를 1 시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 멤브레인을 다시 TBST 용액으로 10 분씩 3 회 세척한 후 기질 용액을 5 분 동안 반응시키고 암실에서 X-ray 필름 상에 감광시켜 밴드를 확인하였다.

5. 통계 분석

모든 실험 결과의 통계 분석에는 PASW Statistics 19 (SPSS Inc., IL, USA) 프로그램을 이용하였다. 고지방 식이와 잣기름의 주효과와 두 식이 요인간 상호작용 효과를 검증하기 위해 이원분산 분석 (two-way ANOVA)을 실시하였다. 주효과가 유의적으로 도출되었을 경우에는 개별 그룹간 비교를 위해 LSD multiple-comparison 을 수행하였다. 상호작용 효과가 유의적으로 도출되었을 경우에는 Student's *t* test 를 통해 두 개의 대응 그룹간 비교를 통해 잣기름의 효과를 검증하였다. 변수 간의 상관 관계를 알아보기 위해서는 Pearson correlation 분석 방법이 사용되었다. 모든 결과는 평균 \pm 표준 오차 (mean \pm SE)로 나타내었으며 모든 통계 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 이루어졌다.

IV. 실험 결과

1. 체중, 백색 지방 및 간 무게, 식이 섭취량

각 군의 체중 및 체중 증가량, 백색 지방 무게, 일일 평균 식이 섭취량 및 칼로리 섭취량을 통계 분석 결과와 함께 Table 5 에 나타내었다. 고지방 식이 섭취군은 일반 식이 섭취군보다 유의적으로 체중 증가량 ($P < 0.001$) 및 백색 지방 무게 ($P < 0.001$)가 많았으며, 잣기름 섭취군은 콩기름 섭취군에 비해 유의적으로 낮은 체중 증가 ($P < 0.001$) 및 백색 지방 무게 ($P < 0.001$)를 보였다. 개별 그룹간 비교를 시행한 결과, 고지방 식이군 중 P10 ($P = 0.01$), P20 ($P = 0.01$), P30 ($P = 0.02$) 군은 각각 S10, S20, S30 군에 비해 각각 유의적으로 적은 체중 증가를 보인 것으로 확인되었다. 백색 지방 무게 역시 P10 ($P = 0.04$), P20 ($P = 0.07$), P30 ($P = 0.02$) 군에서 모두 S10, S20, S30 군보다 적었다. 이는 고지방 식이로 유도한 비만 마우스에서 잣기름이 콩기름에 비해 체중 증가 및 백색 지방 축적을 억제하였음을 보여준다. 또한, PC 군도 SC 군에 비해 백색 지방 무게가 적어 (30% less, $P = 0.05$), 일반 식이에서도 잣기름이 백색 지방 축적을 억제하는 효과를 보였다. 간 무게는 고지방 식이 섭취에 따른 유의적인 영향은 나타나지 않았지만 잣기름 섭취군에서 유의적으로 낮았다 ($P < 0.001$).

개별 그룹간 비교 결과, 고지방 식이 섭취군 중 P10 ($P = 0.002$), P20 ($P = 0.007$), S30 ($P = 0.025$) 군이 S10, S20, S30 군보다 각각 간 무게가 적었다. 식이섭취량은 고지방 식이 섭취군이 일반 식이 섭취군보다 적었으나 ($P < 0.001$), 고지방 식이의 단위 무게당 칼로리가 더 높으므로 칼로리 섭취는 고지방 식이 섭취군이 일반 식이 섭취군 보다 높았다 ($P < 0.001$). 한편, 잣기름 섭취군은 전반적으로 콩기름 섭취군보다 식이 섭취량 ($P = 0.001$)이 적었고, 그에 따라 칼로리 섭취량 ($P = 0.01$) 역시 적었다. 개별 그룹 간 비교 결과, P30 군이 S30 군 보다 유의적으로 식이 섭취량과 칼로리 섭취량이 적은 것으로 나타나, 잣기름 대체 정도가 높은 고지방 식이에서 잣기름이 식이 섭취량 감소에 미치는 영향이 가장 강하게 나타났음을 알 수 있다. 그러나 그 외 P10, P20 군과 잣기름 일반 식이 섭취군인 PC 군은 각 대조군과 칼로리 섭취량에 유의적이 차이가 없었다.

Table 5. Body weight, white adipose tissue weight, liver weight, food intake, and caloric intake of mice fed control or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil¹

	Soybean oil				Pine nut oil				Fat amount, <i>P</i> value	Fat type, <i>P</i> value	Interaction, <i>P</i> value
	Control	High-fat			Control	High-fat					
	SC (n=10)	S10 (n=11)	S20 (n=11)	S30 (n=12)	PC (n=11)	P10 (n=11)	P20 (n=10)	P30 (n=12)			
Body weight at 0wk (g)	17.3 ±0.5	17.0 ±0.4	17.1 ±0.3	16.8 ±0.4	16.7 ±0.4	17.0 ±0.3	16.9 ±0.4	16.7 ±0.4	0.92	0.54	0.91
Body weight at 12wk (g)	32.8 ±1.0 ^{ab}	38.5 ±1.4 ^{de}	39.4 ±1.1 ^e	38.0 ±1.2 ^{de}	30.5 ±0.6 ^a	34.6 ±1.4 ^{bc}	35.4 ±1.1 ^{bcd}	34.6 ±1.2 ^{bc}	<0.001	<0.001	0.88
Weight gain (g)	15.5 ±0.8 ^{ab}	21.5 ±1.4 ^{cd}	22.3 ±1.0 ^d	21.2 ±0.9 ^{cd}	13.8 ±0.6 ^a	17.5 ±1.3 ^b	18.5 ±1.0 ^{bc}	17.8 ±1.1 ^b	<0.001	<0.001	0.71
White adipose tissue weight (g) ²	3.1 ±0.2 ^b	5.3 ±0.4 ^d	5.4 ±0.3 ^d	5.3 ±0.3 ^d	2.2 ±0.2 ^a	4.4 ±0.4 ^c	4.6 ±0.4 ^{cd}	4.2 ±0.3 ^c	<0.001	<0.001	0.99
Liver weight (g)	1.18 ±0.05 ^c	1.21 ±0.06 ^c	1.20 ±0.06 ^c	1.13 ±0.04 ^{bc}	1.09 ±0.03 ^{abc}	1.01 ±0.04 ^{ab}	1.02 ±0.03 ^{ab}	0.99 ±0.03 ^a	0.33	<0.001	0.68

Liver weight % (g/100 g body weight)	3.81 ±0.06 ^c	3.26 ±0.10 ^b	3.18 ±0.12 ^{ab}	3.11 ±0.05 ^{ab}	3.82 ±0.06 ^c	3.09 ±0.06 ^{ab}	3.02 ±0.05 ^a	3.00 ±0.05 ^a	<0.001	0.05	0.62
Average daily Food intake (g/d) ³	3.20 ±0.06 ^d	2.82 ±0.05 ^{bc}	2.86 ±0.03 ^{bc}	2.89 ±0.05 ^c	3.20 ±0.03 ^d	2.76 ±0.04 ^{ab}	2.77 ±0.03 ^{abc}	2.68 ±0.05 ^a	<0.001	0.01	0.11
Average daily caloric Intake (kcal/d)	11.8 ±0.2 ^a	13.1 ±0.2 ^{cd}	13.3 ±0.1 ^{cd}	13.4 ±0.2 ^d	11.8 ±0.1 ^a	12.8 ±0.2 ^{bc}	12.9 ±0.2 ^{bcd}	12.4 ±0.2 ^b	<0.001	0.01	0.08

Values are presented as mean ± SE.

¹Two-way ANOVA was used to determine the main effects of fat amount and fat type and was followed by LSD post-hoc test. Means in a row without a common superscript significantly differ ($P < 0.05$).

²White adipose tissue weight is the sum of weights of epididymal, subcutaneous, and perirenal-retroperitoneal depots.

³Average daily caloric intake (kcal/d) = Average daily food intake (g/d) × Calorie of g diet (kcal/g diet)

2. 혈청 leptin 농도

고지방 식이 섭취군은 일반 식이 섭취군에 비해 혈청 leptin 농도가 유의적으로 높았고 ($P < 0.001$), 잣기름 섭취군은 콩기름 섭취군에 비해 혈청 leptin 농도가 유의적으로 낮았다 ($P < 0.001$). 각 군의 혈청 leptin 농도 측정 결과는 **Figure 4**에 나타내었다. 개별 그룹 비교 결과, P10 군이 S10 군보다 유의적으로 혈청 leptin 농도가 낮았다. 혈청 leptin 농도는 체지방 축적과 양의 상관관계를 가지는 지표로서, 잣기름 섭취군에서 혈중 leptin 농도가 낮은 것은 잣기름 섭취군에서 보인 체중 증가 억제 효과가 체지방량의 감소에 기인한 것임을 시사한다. 이 결과는 앞서 언급한 것과 마찬가지로 잣기름이 콩기름에 비해 체지방 축적을 억제하는 효과가 있음을 보여준다.

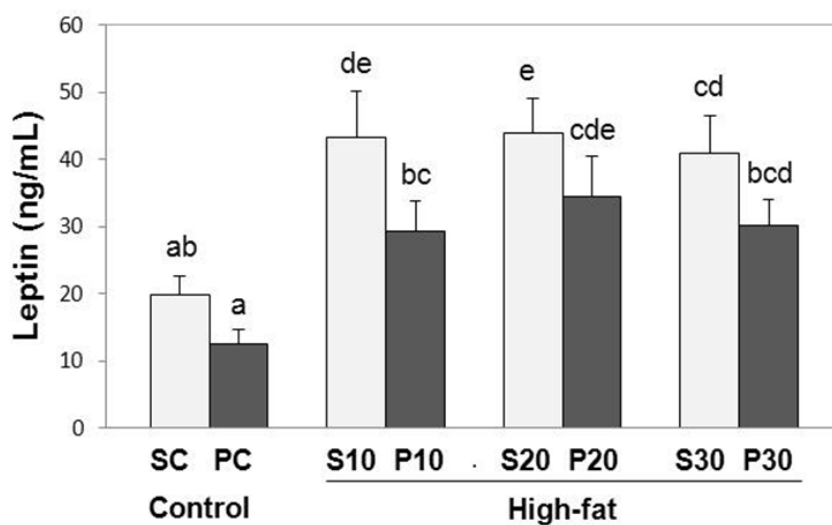


Figure 4. Serum leptin level in mice fed control or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil
 Values are presented as mean \pm SE (n=10-12/group). Two-way ANOVA was used to determine the main effects of fat amount and fat type and was followed by LSD post-hoc test. Labeled means without a common letter significantly differ ($P < 0.05$).

3. 혈중 지질 농도

각 군의 혈중 지질 농도 측정 결과는 **Figure 5**에 나타내었다. 혈중 중성지방 및 유리지방산 농도에는 고지방 식이 및 잣기름 대체 여부에 따른 유의적인 영향이 나타나지 않았다. 혈중 총 콜레스테롤 농도는 고지방 식이 섭취군과 일반 식이 섭취군 간의 차이는 없었지만 잣기름 섭취군에서 콩기름 섭취군보다 유의적으로 낮았다 ($P = 0.01$). 그러나 개별 그룹 간 비교에서 각 대응 그룹 간 유의적 차이는 관찰되지 않았다.

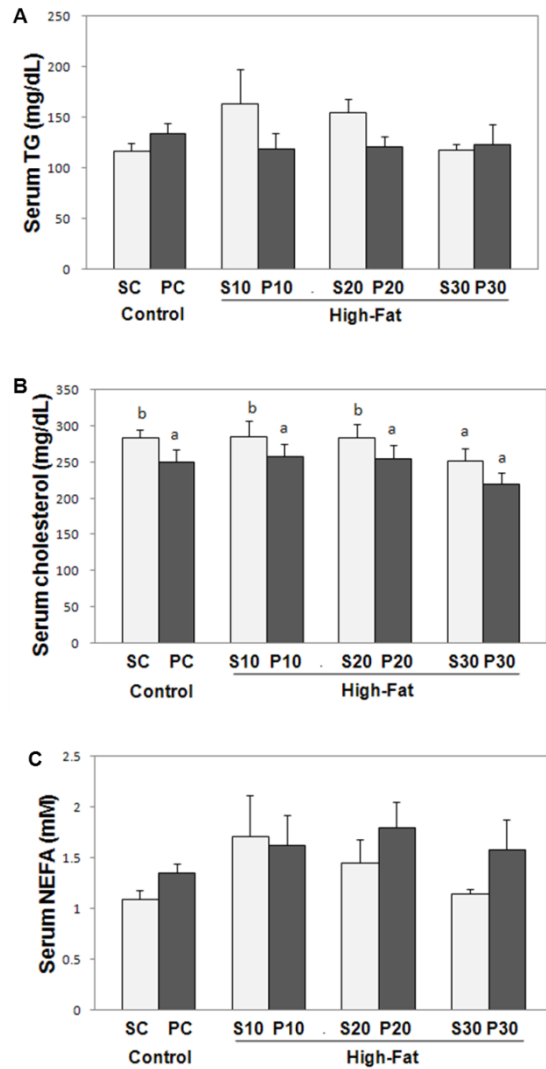


Figure 5. Serum lipids level in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil (A) serum TG, (B) serum cholesterol, (C) serum NEFA (non-esterified fatty acid)

Values are mean \pm SE (n = 10-12/group). Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and oil type and was followed by LSD post-hoc test. Labeled means without a common superscript represent significant difference ($P < 0.05$).

4. 간 지질 농도

고지방 식이로 유도한 비만 마우스에서 지방간이 유발되었는지, 또한 고지방 식이 중 잣기름 대체가 콩기름에 비해 간 내 지방 축적을 유의적으로 낮추는 효과가 있었는지를 검증하게 위하여 간 조직에서 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 측정하였다. 각 군의 간 중성지방과 콜레스테롤 농도 측정 결과를 **Figure 6**에 나타내었다.

간 중성지방 농도는 고지방 식이 섭취에 따라서는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 잣기름 섭취군에서 콩기름 섭취군에 비해 유의적으로 낮았다 ($P = 0.04$). 개별 그룹 간 비교를 통해 고지방 식이 섭취군 중 P10 군이 S10 군보다 간 중성지방 농도가 유의적으로 낮음을 확인하였다 ($P = 0.007$). 한편, 간 콜레스테롤 농도는 일반 식이 섭취군보다 고지방 식이 섭취군에서 오히려 낮았고 ($P = 0.002$) 잣기름 섭취군에서는 콩기름 섭취군보다 높은 ($P = 0.01$) 패턴을 보였다.

이상의 결과를 통하여, 잣기름의 간 내 중성지방 축적 억제 효과를 확인하였다. 체지방 축적 억제 효과와 마찬가지로 간 내 중성지방 축적을 억제하는 효과 역시 일반 식이 섭취군보다 고지방 식이 섭취군에서 더 큰 차이를 보였으며, 특히 고지방 식이 섭취군 중 P10 군에서 가장 뚜렷하게 관찰되었다. 따라서 추후 잣기름의 간 지방증 완화 기전에 대한 연구는 일반 식이 섭취군의 SC, PC 군과 고지방 식이 섭취군의 S10, P10 군으로 한정하여 수행되었다.

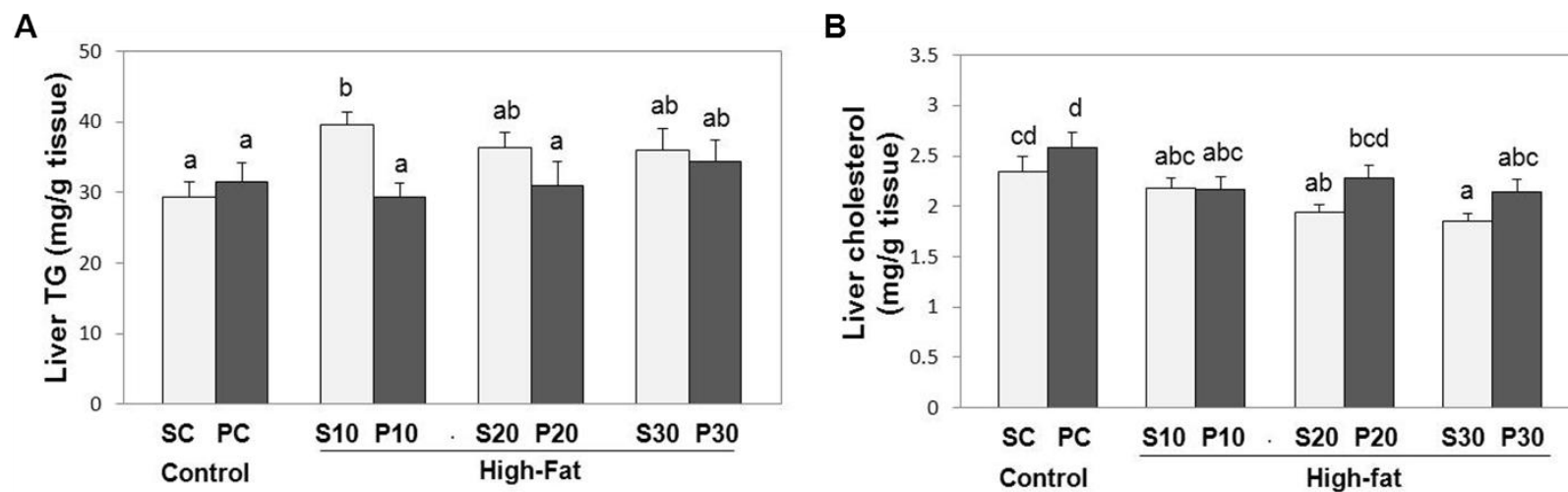


Figure 6. Hepatic lipids level in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil (A) Liver TG concentration, (B) Liver cholesterol concentration
 Values are mean \pm SE (n = 10-12/group). Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and oil type and was followed by LSD post-hoc test. Labeled means without a common superscript represent significant difference ($P < 0.05$).

5. 혈중 fetuin-A 농도 및 간 조직에서 fetuin-A mRNA 수준

지방간 발생 및 완화 여부를 보다 분명히 확인하기 위해, fetuin-A 를 지표로 선정하여 고지방 식이 및 잣기름 대체가 혈중 fetuin-A 농도와 간 조직에서의 fetuin-A 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 각 군의 혈중 fetuin-A 농도와 간 조직에서의 fetuin-A mRNA 수준 측정 결과를 **Figure 7**에 나타내었다.

본 연구에서 간 조직에서의 fetuin-A mRNA 수준은 고지방 식이 섭취군에서 유의적으로 높았으나 ($P = 0.02$), 혈중 fetuin-A 농도를 측정한 결과에서는 고지방 식이 섭취에 따른 유의적인 영향이 나타나지 않았다. 오히려, 혈중 fetuin-A 농도는 체중 ($r = -0.54$, $P = 0.006$) 및 백색 지방 무게 ($r = -0.46$, $P = 0.02$)와 음의 상관 관계를 보였다. 또한, 잣기름 섭취군에서는 간 지방증이 나타나지 않았음에도 불구하고, 잣기름 섭취군에서 간 조직 fetuin-A mRNA 수준이 높은 경향이 있었다 (1.4-fold, $P = 0.1$). 간에서의 fetuin-A mRNA 수준은 지방산화 관련 지표들의 mRNA 수준과 양의 상관 관계를 나타냈다 ($Ppar\alpha$, $r = 0.56$, $P = 0.005$; $Acadl$, $r = 0.84$, $P < 0.001$; $Hadh\alpha$, $r = 0.70$, $P < 0.001$; $Acox1$, $r = 0.49$, $P = 0.02$).

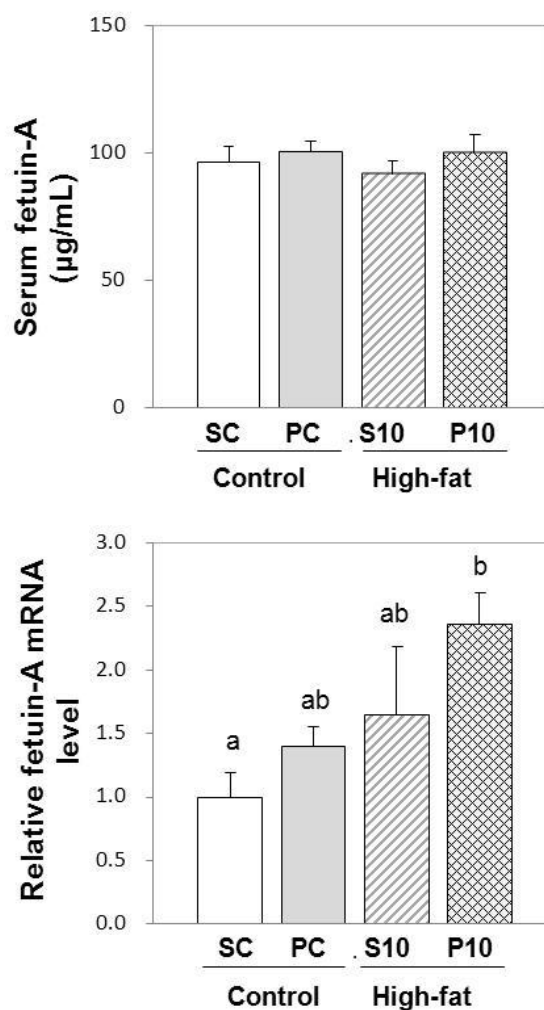


Figure 7. Serum fetuin-A level and relative fetuin-A mRNA level in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil (A) Serum fetuin-A level, (B) relative fetuin-A mRNA level

Values are mean \pm SE (n=10-11/group). Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and oil type and was followed by LSD post-hoc test. Labeled means without a common superscript represent significant difference ($P < 0.05$).

6. 간 조직에서 지방산화 관련 지표들의 mRNA 수준

젓기름 고지방 식이 섭취군에서 간 중성지방 축적이 저해된 현상의 원인 기전을 규명하기 위해, 간 조직에서 지방산화 관련 지표들의 mRNA 수준을 측정하였다. 각 군에서 지방산화 관련 지표의 mRNA 수준을 측정한 결과를 **Figure 8**에 나타내었다. 세포질에서 미토콘드리아로 장쇄 지방산을 운반하는 과정의 속도제한 효소인 *Cpt1a*의 mRNA 수준이 고지방 식이 섭취군에서 유의적으로 낮았고 (0.7-fold, $P = 0.04$), 항산화 과정에 관여하는 효소인 *Sod2*의 mRNA 수준은 고지방 식이 섭취군에서 유의적으로 높았다 (1.3-fold, $P = 0.006$). 그러나 젓기름의 섭취는 *Cpt1a*와 *Sod2*의 mRNA 수준에 유의적인 영향을 미치지 못했다. 반면, 미토콘드리아에서 베타산화의 첫 번째 과정을 촉매하는 효소이자 베타산화의 속도제한 효소인 *Acadl*의 mRNA 수준은 젓기름 섭취군에서 유의적으로 높았다 (1.5-fold, $P = 0.05$). 개별 그룹 간 비교 결과, 고지방 식이 섭취군에서 P10 군이 S10 군보다 *Acadl* mRNA 수준이 높은 경향을 보였다 (1.6-fold, $P = 0.08$). *Ppar α* , *Acox1*, *Hadh α* , *Cyp4a10*, *Ucp2*의 mRNA 수준은 고지방 식이 섭취 및 젓기름 대체 여부에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다.

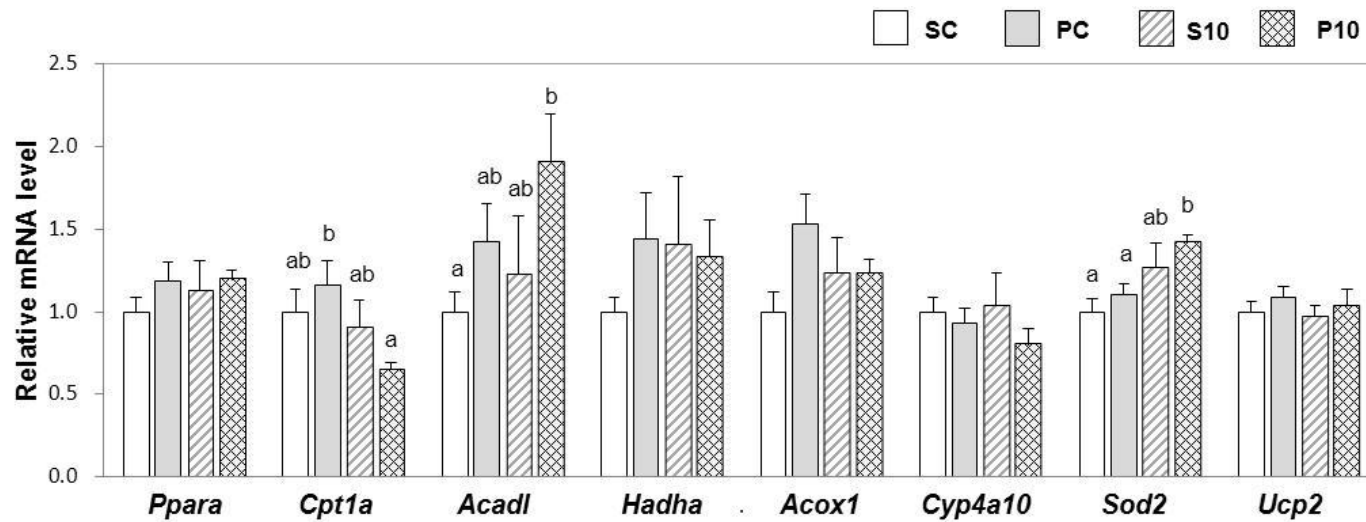


Figure 8. Relative mRNA level of genes involved in fatty acid oxidation in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil

The mRNA expression level was measured by realtime PCR method. Values are mean \pm SE (n = 6/group). Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and oil type and was followed by LSD post-hoc test. Labeled means without a common superscript represent significant difference ($P < 0.05$).

7. 간 조직에서 지방합성 관련 지표들의 mRNA 수준

젓기름이 지방합성 기전에 미치는 영향을 알아보기 위해 간 조직에서 지방합성 기전에 관여하는 지표들의 mRNA 수준을 측정하였다. 각 군에서 지방합성 관련 지표들의 mRNA 수준을 측정한 결과를 **Figure 9**에 나타내었다. 본 연구에서, 고지방 식이 섭취군의 *Pparg* mRNA 수준은 일반 식이 섭취군에 비해 높게 나타나지 않았다. 반면, 일반 식이 섭취군에서는 PC 군에서 SC 군보다 *Pparg* mRNA 수준이 현저하게 낮았다 (0.5-fold, $P = 0.003$). *Srebf1*, *Fasn*, *Slc25a1*, *Fabp1*, *Cd36*의 mRNA 수준은 고지방 식이의 섭취 및 젓기름 대체 여부에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다.

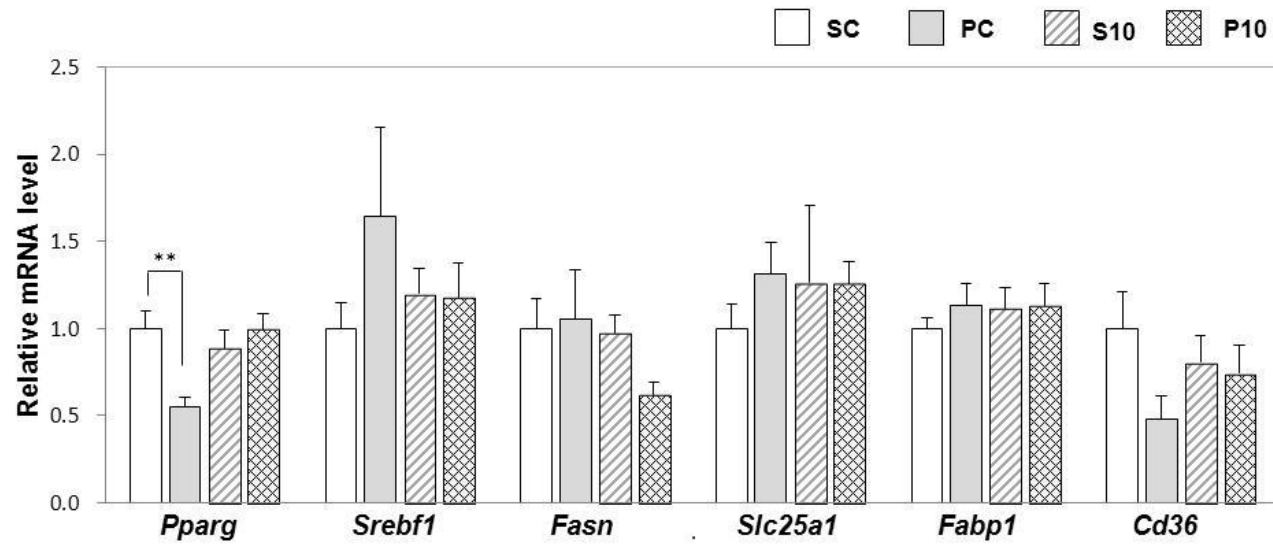


Figure 9. Relative mRNA level of genes involved in lipogenic pathways in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil

The mRNA expression level was measured by realtime PCR method. Values are mean \pm SE (n = 6/group). Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and oil type. Student's *t* test was used for comparison between PC and SC groups or P10 and S10 groups because the interaction effect was significant (**, $P < 0.01$).

8. 백색 지방 조직에서 SIRT3 의 단백질 발현

젓기름 섭취군에서 나타난 대사적 특성이 칼로리제한 식이를 적용했을 때와 비슷하다고 사료되었으므로, 젓기름의 섭취가 칼로리제한을 모방한 효과를 유도하였는지를 확인하기 위하여 백색 지방에서 SIRT (sirtuin) 3 단백질의 발현을 측정하였다. SIRT3 는 칼로리제한 식이 섭취 시 나타나는 건강 증진 효과를 매개하는 것으로 알려진 단백질인 SIRT 의 하나로써, 젓기름 섭취군에서 그 발현이 유의적으로 증가하였는지를 알아보려고 하였다. 백색 지방에서 각 군의 SIRT3 단백질 발현을 측정한 결과를 **Figure 10** 에 나타내었다. 백색 지방에서 SIRT3 의 발현은 일반 식이 섭취군에 비해 S10 군에서 유의적으로 낮았다 ($P < 0.001$). P10 군은 S10 군에 비해 SIRT3 단백질 발현이 유의적으로 높아 ($P < 0.001$), 고지방 식이를 섭취하였음에도 불구하고 일반 식이를 섭취한 군과 비슷한 수준으로 발현이 유지됨을 확인하였다.

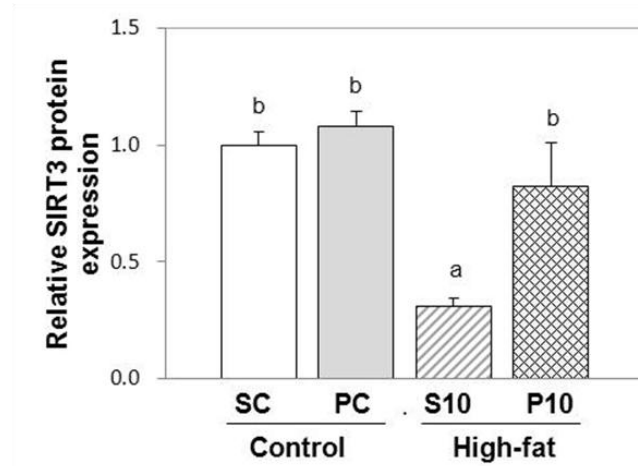
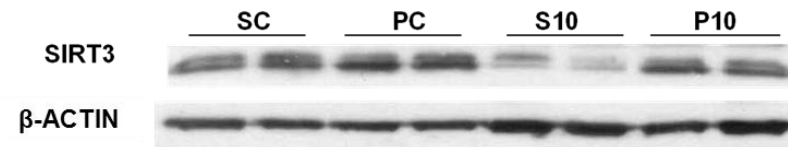


Figure 10. Epididymal SIRT3 protein expression in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil

The intensity of SIRT3 band was densitometrically measured and normalized to the protein expression level of β -actin. Values are mean \pm SE (n = 5-6/group). Two-way ANOVA was used to determine the significant effect of fat amount and oil type and was followed by LSD post-hoc test. Means without a common superscript significantly differ ($P < 0.05$).

V. 고찰

지방간 진단 기준에 따르면, 조직학적 관찰 시 전체 세포의 5% 이상에서 지방 축적이 발견되는 경우 혹은 간 내 지방량이 전체 간 무게의 5%를 넘는 경우에 지방간으로 진단한다 (Fabbrini et al., 2010). 본 연구에서는 고지방 식이 섭취군에서 간 중성지방 양이 전체 간 무게의 5%를 넘지 않았다. 따라서, 본 연구에서 12 주 동안의 고지방 식이 (45% 칼로리 지방) 섭취는 가벼운 간 내 지방 축적만을 유도하였으며, 보다 심각한 간 기능 손상으로는 진행되지 않은 상태인 것으로 판단된다. 비알콜성 지방간은 단순 지방증에서 지방간염, 간섬유화증 및 간경화로 발전하는데, 단순 지방증을 제외한 나머지에서는 염증 소견이 함께 나타나며 따라서 염증 반응의 조절이 중요한 치료 타겟이 된다 (Fabbrini, 2010). 그러나 본 연구에서 유도한 비만 모델은 지방간 발생 단계 중 단순 지방증의 초기 단계에 있는 것으로 보이므로, 간 내 지방축적의 초기 단계에 관여하는 유전자, 특히 지방의 산화와 합성에 관여하는 유전자의 mRNA 수준에 나타나는 영향을 중점적으로 탐색하였다.

45% 칼로리를 지방으로 공급하는 고지방 식이 중 10, 20, 30%를 각각 갖기름으로 대체하였을 때, 세 경우 모두 갖기름 섭취군이 콩기름 섭취군에 비하여 간 내 중성지방 축적이 적었으나 10% 대체 시에 그 차이가 가장 현저하게 나타났다. 갖기름의 대조 시료로서 사용된 콩기름 역시 60% 이상의 다가불포화 지방산을 포함하므로, 콩기름 포함량

이 많아짐에 따라 식이 중에 포함된 다가불포화 지방산도 많아지게 된다. 다가불포화 지방산의 섭취는 포화지방산에 비하여 간 내 지방축적을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Lottenberg et al., 2012). 따라서 가장 적은 대체 수준인 10%에서 잣기름의 간 중성지방 축적 억제 효과의 차이가 가장 현저했던 것은, 잣기름 대체 수준이 높아질수록 대응하는 콩기름 섭취군에서도 간 중성지방 축적이 적어지면서 잣기름 섭취군과의 차이가 줄어들었기 때문으로 보인다. 잣기름의 기능 중 지방간 예방 및 치료 보조 목적에 관한 연구는 아직 초기 단계에 머물러 있으나, 본 연구에서 대체 정도가 가장 적었을 때 가장 큰 예방 효과를 나타낸 것은 실제 식이중재 방안에 적용했을 때의 실효성 면에서도 가능성을 보였다고 생각할 수 있다.

고지방 식이 섭취군 중 P10 군에서 S10 군보다 간 중성지방 축적이 적었던 원인의 하나로, 잣기름 섭취군에서 *Acadl* mRNA 수준이 높았던 것을 들 수 있다. *Acadl* 은 미토콘드리아에서 장쇄 지방산 베타산화 과정의 첫 단계를 촉매하는 효소로서 베타산화 과정의 속도제한 효소이기도 하다. 즉, 잣기름이 지방산화를 촉진함으로써 간 내 지방 축적을 줄이는 데 기여하였을 가능성이 있다. 또한, 이원 분산 분석 결과에서 잣기름 대체 여부에 따른 주효과는 유의적으로 도출되지 않았지만, 지방신생합성에 관여하는 효소인 *Fasn* 의 mRNA 수준이 P10 군에서 S10 군보다 낮았다 (Student's *t*-test, $P = 0.02$). 간 지방증이 있을 경우, 간 내에 지방이 과도하게 존재함에도 불구하고 지방신생합성 기전

이 억제되지 않고 오히려 활성화되어 있음이 보고되어 있으며, 이는 간 내 지방축적을 더욱 심화시키는 요인으로 작용한다 (Postic et al., 2008). 따라서, 본 연구에서 P10 군이 S10 군보다 *Fasn* mRNA 수준이 적었던 것은, 고지방 식이 섭취에 따라 간으로 과도한 지방이 유입되는 상황에서 P10 군에서는 지방신생합성을 줄이는 방향으로 조절이 일어난 반면, S10 군에서는 이 조절에 실패하였다고도 해석할 수 있다. 선행 연구에서 CLA와 갖기름을 함께 섭취한 마우스 모델은 CLA만 섭취한 마우스 모델보다 *Fasn* mRNA 수준이 적고, 간 내 지방축적이 저하되었음이 보고되었다 (Ferramosca, 2008a). 이는 본 연구의 결과와도 일치하는 것으로, 지방간 발생의 초기 단계에서 지방신생합성 조절 유지의 중요성을 시사한다. 한편, 본 연구에서는 간 내 콜레스테롤 저장량이 고지방 식이 섭취군에서 일반 식이 섭취군에 비해 오히려 적게 나타났다. 본 연구에서 사용한 고지방 식이에는 따로 콜레스테롤을 첨가하지 않았으며, 0.02% (w/w) 콜레스테롤이 라아드로부터 공급되었다. 따라서, 고지방 식이 섭취에 의해 간에서 VLDL 및 담즙 합성을 위한 콜레스테롤 필요량이 증가함에 따라 콜레스테롤 사용량이 많아진 것이 그 원인으로 추측된다 (Desmarchelier et al., 2012).

Fetuin-A에 관한 연구는 체중 증가, 인슐린 저항증, 비알콜성 지방간과 관련하여 이루어져 왔다 (Brix et al., 2010; Reinehr et al., 2008; Stefan et al., 2008; Stefan et al., 2006). 선행 연구에 따르면 fetuin-A는 사람에게서 간 내 지방축적과 양의 상관 관계를 보였고, 지

방간이 있는 마우스에서 그렇지 않은 마우스보다 간에서의 fetuin-A mRNA 수준이 더 높게 나타났다 (Stefan et al., 2006). 본 연구에서도, 고지방 식이 섭취군에서 일반 식이 섭취군보다 간에서의 fetuin-A mRNA 수준이 더 많았다. 하지만 혈중 fetuin-A 농도에서는 고지방 식이 섭취군과 일반 식이 섭취군간 차이가 나타나지 않았다. Fetuin-A 가 혈액 중에 수백 $\mu\text{g/ml}$ 단위로 다량 존재하는 단백질임을 고려할 때, 간에서의 fetuin-A 합성 증가 정도가 혈중 농도의 유의적인 변화를 유도할 만큼 크지 않았을 가능성을 고려해 볼 수 있다. 간으로부터 합성된 fetuin-A 의 혈중 분비 기전에 대해서는 거의 알려진 바가 없으므로, 전사 이후의 단계에서 아직 알려지지 않은 조절 단계가 개입하였을 가능성도 배제할 수 없다. 또한, 본 연구에서 혈중 fetuin-A 농도는 체중 증가와 음의 상관 관계를 보여, 선행 연구 결과와 반대 경향을 띠었다. 간에서의 fetuin-A mRNA 수준 역시, 체중이 췌기를 섭취군보다 더 적고 간 지방증도 나타나지 않았던 췌기를 섭취군에서 더 높았다. 다른 지표들과의 상관관계를 분석해 본 결과, fetuin-A mRNA 수준은 지방산화 관련 지표들과 높은 양의 상관관계를 나타냈다. 이 것은 fetuin-A mRNA 수준이 포도당 및 지질 대사 관련 효소들의 mRNA 수준과 유의적인 상관관계를 보였다는 최근의 연구와 일부 일치하는 결과이다 (Haukeland et al., 2012). Fetuin-A mRNA 수준은 지방산화와 밀접한 관련이 있는 것으로 보이며 fetuin-A 와 지방산화의 관계를 규명하기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Pparg 는 지방조직에 주로 많은 양이 발현되며, 지방세포의 분화에 중요한 역할을 한다. 따라서 항비만 물질을 탐색하기 위한 여러 연구들에서 연구 대상 물질들이 지방세포 분화를 억제하는지를 알아보기 위한 지표로서 *Pparg* mRNA 수준 또는 단백질 발현을 측정하는 경우가 많다. 최근 연구 결과에 따르면, 비알콜성 지방간 환자군은 대조군에 비해 간에서 *Pparg* mRNA 수준이 높았음이 보고되었다 (Pettinelli et al., 2011). 원래 간 세포에서는 mRNA 수준이 낮은 유전자이지만 간 내 지방축적이 많아짐에 따라 수준이 증가한다는 것이다. 이는 지방세포 분화를 촉진하는 *Pparg* 기능과 맥락을 같이 한다고도 볼 수 있다. 본 연구에서는 고지방 식이 섭취군에서 일반 식이 섭취군에 비해 *Pparg* mRNA 수준이 높지 않아, 고지방 식이 섭취군에서도 가벼운 지방증만이 유도되었음을 알 수 있다. 한편, 칼로리제한 식이를 섭취한 마우스는 일반 식이를 섭취한 마우스에 비해 간의 *Pparg* mRNA 수준이 낮다는 보고가 있다 (Mulligan et al., 2008). 본 연구에서, 일반 식이 섭취군 중 PC 군의 *Pparg* mRNA 수준은 SC 군의 50% 수준으로 낮아져 있었다. 혈청 유리지방산 농도 역시 백색 지방 무게가 더 적었던 PC 군에서 오히려 SC 군보다 높은 패턴을 보였다 (Student' s *t*-test, $P = 0.03$). 비만이 아닌 일반 정상체중 마우스에서 장기간 칼로리제한 식이를 섭취하게 하면 공복 상태에서 혈중 유리지방산 농도가 상승하는 것으로 알려져 있다 (Bruss et al., 2010). 이는 저장 지방을 보다 용이하게 에너지원으로 사용하기 위한 작용으로서 장기간의 칼로리제한에 대한 적응적 반응이라고

볼 수 있다. 따라서, PC 군은 정상체중인 동물 모델에서 칼로리를 제한했을 때와 비슷한 대사적 특징을 보이는 것으로 사료된다.

жат기름의 식욕억제 효과는 여러 연구를 통해 연구된 바 있다. ж기름은 소화관 포만 호르몬의 분비를 촉진하는 역할을 한다고 알려져 있으며 (Pasman, 2008), 실제로 피험자들에게 식사 전에 ж기름 캡슐을 공급했을 경우, 그렇지 않을 때보다 식사 섭취량이 적었다는 보고가 있다 (Hughes, 2008). 본 연구에서도 ж기름 고지방 섭취군이 콩기름 고지방 섭취군보다 전반적으로 식사 섭취량이 적은 것으로 나타났다. 그러나 개별그룹 비교 결과를 살펴보면, 이 차이는 ж기름 대체 수준이 가장 높았던 P30 군에서 S30 군에 비해 유의적이었고, P10, P20 군은 S10, S20 군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이는 기존에 보고되었던 ж기름의 식욕억제 효과와 일부 일치하는 결과이다. 그러나 대응하는 콩기름 섭취군과 식이 섭취량 차이가 유의적이지 않았던 P10 군에서 체중 증가, 백색 지방 축적 및 간 중성지방 축적 차이가 가장 크게 나타난 것으로 볼 때, ж기름이 식욕억제 외의 다른 추가적인 작용을 할 가능성도 배제할 수 없다. P10 군에서 나타난 ж기름의 간 중성지방 축적 억제 효과는 전반적인 체지방 감소를 동반한 것으로, 이 역시 비만 동물 모델에서 칼로리제한 식이를 섭취시켰을 때와 비슷한 경향이다.

SIRT 는 탈아세틸화 작용을 촉매하는 효소에 속하는 단백질로, 세포 내에 존재하는 NAD^+ 농도가 높을 때 활성이 증가한다. 따라서, SIRT 는 칼로리제한 상황에서 발현 및 활성이 증가하며, 칼로리제한 식

이 적용에 따른 체지방 감소, 인슐린 민감도 증가, 암 예방, 수명 연장 등의 건강 증진 효과를 매개하는 것으로 알려져 있다. SIRT는 총 7 종류 (SIRT1-7)인데, 그 중 SIRT3는 미토콘드리아 기능 조절에 관여하며, 특히 지방산 대사에 관여하는 미토콘드리아 효소들 중 아세틸화에 의해 조절되는 효소들의 활성을 조절한다고 보고되었다 (Hirschey et al., 2010; Qiu et al., 2010). 본 연구에서는, 백색 지방 조직에서 SIRT3 단백질의 발현이 S10 군에서는 저하된 반면, P10 군에서는 일반식이 섭취군과 비슷한 수준으로 유지되어 있었다. 이 결과는 P10 군에 나타난 대사적 특징이 가벼운 칼로리제한에 의한 것이라는 추측을 지지하는 결과이다. 또한, 잣기름이 백색 지방 조직에서 고지방 식이 섭취에 따른 SIRT3의 발현 감소로 인해 초래되는 미토콘드리아 기능 저하 및 손상을 완화할 수 있음을 시사한다. 간 지방증이 비만의 합병증으로서 간에서 나타나는 대사 증후군 증상임을 감안할 때, P10 군에서 간 중성 지방 축적이 억제된 것 역시 잣기름 대체가 칼로리제한과 비슷한 효과를 유발함으로써 고지방 식이 섭취에 의한 체지방 축적을 억제하고 전반적인 체내 대사를 개선시킴으로써 나타난 우회적 효과일 수 있다고 사료된다. 이처럼 잣기름 섭취군에서 칼로리제한 식이를 섭취시켰을 때와 비슷한 특징이 나타난 이유로, 잣기름이 장에서의 지질 이용을 방해함으로써 잣기름 섭취군에서 실제 섭취한 양보다 적은 양의 지질 흡수가 일어났을 가능성이 있다. 잣기름이 장 내 지질 흡수에 미치는 영향과 관련하여 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

VI. 요약

1. 본 연구에서는 고지방 식이 중 일부를 잣기름으로 대체하였을 때, 잣기름이 고지방 식이로 유도한 비만 및 간 지방증을 완화할 수 있는지에 대해 연구하였다.
2. 45% 칼로리를 지방으로 공급하는 고지방 식이 중 10, 20, 30% 칼로리를 각각 잣기름 (P10, P20, P30) 또는 콩기름 (S10, S20, S30)으로, 나머지는 라아드로 공급하도록 하였다. 일반 식이는 10% 칼로리를 잣기름 (PC) 또는 콩기름으로부터 공급하도록 설정하였다 (SC).
3. 고지방 식이 섭취군의 P10, P20, P30 군은 각각 S10, S20, S30 군보다 적은 체중 증가량 및 백색 지방 무게를 나타냈다. 일반 식이 섭취군 중 PC 군의 백색 지방 무게 역시 SC 군보다 적었다.
4. 고지방 식이 섭취군 중 잣기름 대체 정도가 가장 높았던 P30 군은 S30 군보다 칼로리 섭취량이 유의적으로 적었으며, 그 외 P10, P20 군과 잣기름 일반 식이 섭취군인 PC 군은 각 대조군과 칼로리 섭취량에 유의적인 차이가 없었다.
5. 간 중성지방 축적은 전반적으로 잣기름 섭취군이 콩기름 섭취군에 비해 유의적으로 적었으며, 특히 P10 군에서 그 차이가 가장 크게 나타났다.
6. 잣기름 섭취군에서 미토콘드리아에서 지방산의 베타산화를 촉매하는

효소인 *Acadl*의 mRNA 수준이 높았다.

7. 일반 식이 섭취군 중 PC 군의 간 *Pparg* mRNA 수준은 SC 군의 50% 수준으로 낮았다.

8. 백색 지방에서 S10 군의 SIRT3 단백질 발현이 일반 식이 섭취군에 비해 낮았던 반면, P10 군의 SIRT3 단백질 발현은 S10 군에 비해 유의적으로 높고 일반 식이 섭취군에서의 수준으로 회복되어 있었다.

9. 잣기름 대체가 칼로리제한과 비슷한 효과를 유발함으로써 고지방 식이 섭취에 따른 체지방 축적을 억제하고 전반적인 체내 에너지 대사를 개선한 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, Matsumoto T, Takii Y, Kusumoto K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2006;26:39-45.
- Abumrad NA, Davidson NO. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev.* 2012;92:1061-85.
- Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev.* 2008;60:311-57.
- Asset G, Bauge E, Wolff RL, Fruchart JC, Dallongeville J. Pinus pinaster oil affects lipoprotein metabolism in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 1999a;129:1972-8.
- Asset G, Bauge E, Wolff RL, Fruchart JC, Dallongeville J. Effects of dietary maritime pine seed oil on lipoprotein metabolism and atherosclerosis development in mice expressing human apolipoprotein B. *Eur J Nutr.* 2001;40:268-74.
- Asset G, Leroy A, Bauge E, Wolff RL, Fruchart JC, Dallongeville J. Effects of dietary maritime pine (Pinus pinaster)-seed oil on high-density lipoprotein levels and in vitro cholesterol efflux in mice expressing human apolipoprotein A-I. *Br J Nutr.* 2000;84:353-60.
- Asset G, Staels B, Wolff RL, Bauge E, Madj Z, Fruchart JC, Dallongeville J. Effects of Pinus pinaster and Pinus koraiensis seed oil supplementation on

- lipoprotein metabolism in the rat. *Lipids*. 1999b;34:39-44.
- Bahcecioglu IH, Yalniz M, Ataseven H, Ilhan N, Ozercan IH, Seckin D, Sahin K. Levels of serum hyaluronic acid, TNF-alpha and IL-8 in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:1549-53.
- Brix JM, Stingl H, Hollerl F, Schernthaner GH, Kopp HP, Schernthaner G. Elevated Fetuin-A concentrations in morbid obesity decrease after dramatic weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:4877-81.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40:1387-95.
- Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. *Modern Pathol*. 2007;20 Suppl 1:S40-8.
- Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298:E108-16.
- Chavez-Tapia NN, Uribe M, Ponciano-Rodriguez G, Medina-Santillan R, Mendez-Sanchez N. New insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2009;8 Suppl 1:S9-17.
- Chuang LT, Tsai PJ, Lee CL, Huang YS. Uptake and incorporation of pinolenic acid reduces n-6 polyunsaturated fatty acid and downstream prostaglandin formation in murine macrophage. *Lipids*. 2009;44:217-24.
- Desmarchelier C, Dahlhoff C, Keller S, Sailer M, Jahreis G, Daniel H. C57Bl/6 N mice on a western diet display reduced intestinal and hepatic cholesterol levels despite a plasma hypercholesterolemia. *BMC Genomics*. 2012;13:84.
- Diano S, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and

lipid metabolism. *Trends Mol Med*. 2012;18:52-8.

Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T.

Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol*. 2012;47:586-95.

Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10:355-61.

Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S.

Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134:424-31.

Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease:

biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010;51:679-89.

Ferramosca A, Savy V, Conte L, Zara V. Dietary combination of conjugated

linoleic acid (CLA) and pine nut oil prevents CLA-induced fatty liver in mice. *J Agr Food Chem*. 2008a;56:8148-58.

Ferramosca A, Savy V, Einerhand AWC, Zara V. Pinus koraiensis seed oil

(PinnoThin) supplementation reduces body weight gain and lipid concentration in liver and plasma of mice. *J Anim Feed Sci*. 2008b;17:621-30.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and

purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497-509.

Haukeland JW, Dahl TB, Yndestad A, Gladhaug IP, Loberg EM, Haaland T,

Konopski Z, Wium C, Aasheim ET, Johansen OE, Aukrust P, Halvorsen B,

Birkeland KI. Fetuin A in nonalcoholic fatty liver disease: in vivo and in vitro

- studies. *Eur J Endocrinol*. 2012;166:503-10.
- He J, Lee JH, Febbraio M, Xie W. The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. *Exp Biol Med*. 2011;236:1116-21.
- Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, Harris C, Biddinger S, Ilkayeva OR, Stevens RD, Li Y, Saha AK, Ruderman NB, Bain JR, Newgard CB, Farese RV, Jr., Alt FW, Kahn CR, Verdin E. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*. 2010;464:121-5.
- Hughes GM, Boyland EJ, Williams NJ, Mennen L, Scott C, Kirkham TC, Harrold JA, Keizer HG, Halford JC. The effect of Korean pine nut oil (PinnoThin) on food intake, feeding behaviour and appetite: a double-blind placebo-controlled trial. *Lipids Health Dis*. 2008;7:6.
- Lee JW, Lee KW, Lee SW, Kim IH, Rhee C. Selective increase in pinolenic acid (all-cis-5,9,12-18:3) in Korean pine nut oil by crystallization and its effect on LDL-receptor activity. *Lipids*. 2004;39:383-7.
- Liu Q, Bengmark S, Qu S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis*. 2010;9:42.
- Lottenberg AM, Afonso Mda S, Lavrador MS, Machado RM, Nakandakare ER. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. 2012;23:1027-40.
- Makowski L, Hotamisligil GS. The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2005;16:543-8.
- Mathews ST, Singh GP, Ranalletta M, Cintron VJ, Qiang X, Goustin AS, Jen KL,

- Charron MJ, Jahnen-Dechent W, Grunberger G. Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes*. 2002;51:2450-8.
- Matsuo N, Osada K, Kodama T, Lim BO, Nakao A, Yamada K, Sugano M. Effects of gamma-linolenic acid and its positional isomer pinolenic acid on immune parameters of brown-Norway rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty acids*. 1996;55:223-9.
- Mulligan JD, Stewart AM, Saupe KW. Downregulation of plasma insulin levels and hepatic PPARgamma expression during the first week of caloric restriction in mice. *Exp Gerontol*. 2008;43:146-53.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res*. 2009;48:1-26.
- The Rural Development Administration. Food Composition Table, 8th Revision. Suwon: The Rural Development Administration; 2011.
- Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Keum DK, Kim BI. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21:138-43.
- Pasman WJ, Heimerikx J, Rubingh CM, van den Berg R, O'Shea M, Gambelli L, Hendriks HF, Einerhand AW, Scott C, Keizer HG, Mennen LI. The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids Health Dis*. 2008;7:10.
- Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to

- SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:1424-30.
- Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab.* 2008;34:643-8.
- Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab.* 2010;12:662-7.
- Rasmussen BB, Holmbäck UC, Volpi E, Morio-Liondore B, Paddon-Jones D, Wolfe RR. Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *J Clin Invest.* 2002;110:1687-93.
- Ravikumar B, Carey PE, Snaar JE, Deelchand DK, Cook DB, Neely RD, English PT, Firbank MJ, Morris PG, Taylor R. Real-time assessment of postprandial fat storage in liver and skeletal muscle in health and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:E789-97.
- Reinehr T, Roth CL. Fetuin-A and its relation to metabolic syndrome and fatty liver disease in obese children before and after weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;93:4479-85.
- Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;5:233-44.
- Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res.* 2001;40:439-52.
- Stefan N, Fritsche A, Weikert C, Boeing H, Joost HG, Haring HU, Schulze MB. Plasma fetuin-A levels and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2008;57:2762-7.

- Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Krober SM, Machicao F, Fritsche A, Haring HU. Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes care*. 2006;29:853-7.
- Tanaka T, Hattori T, Kouchi M, Hirano K, Satouchi K. Methylene-interrupted double bond in polyunsaturated fatty acid is an essential structure for metabolism by the fatty acid chain elongation system of rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1393:299-306.
- Verhoef SP, Westerterp KR. No effects of Korean pine nut triacylglycerol on satiety and energy intake. *Nutr Metab*. 2011;8:79.
- Wolff RL, Bayard CC. Fatty acid composition of some pine seed oils. *J Am Oil Chem Soc*. 1995;72:1043-6.
- Wolff RL, Pedrono F, Pasquier E, Marpeau AM. General characteristics of *Pinus* spp. seed fatty acid compositions, and importance of delta5-olefinic acids in the taxonomy and phylogeny of the genus. *Lipids*. 2000;35:1-22.
- Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol*. 2007;128:837-47.
- Yoon T. Fatty acid composition of Total lipids from seeds of *Pinus koraiensis*. *J Kor Soc Food Nutr*. 1987;16(2):93-97.
- Zelber-Sagi S, Ratzin V, Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*. 2011;17:3377-89.

약어 목록

$\Delta 5$ -UPIFA; $\Delta 5$ -unsaturated polymethylene-interrupted fatty acids

ACADL; long-chain acyl-CoA dehydrogenase,

ACC; acetyl-CoA carboxylase

ACOX; acyl-CoA oxidase

AHSG; alpha-2-HS-glycoprotein

CCK; cholecystokinin

CD36; Cluster of differentiation 36

CLA; conjugated linoleic acid

CPT; carnitine palmitoyltransferase

CYP4A10; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10

FABP; fatty acid binding protein

FASN; fatty acid synthase

HADH; hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

HDL; high-density lipoprotein

IFN; interferon

IL; interleukin

LDL; low-density lipoprotein

NEFA; non-esterified fatty acid

PPAR; peroxisome proliferator activated receptor

SIRT; sirtuin

SLC25a1; solute carrier family 25, member 1

SOD; superoxide dismutase

TNF; tumor necrosis factor

UCP; uncoupling protein

VLDL; very low-density lipoprotein

부 록

Appendix 1. Impact of pine nut oil on weight gain and immune responses in high-fat diet-induced obese mice

1. Introduction

Pine nuts, which are oily seeds of the *pinus* species, have been used for culinary purposes around the world for centuries. *Pinus koraiensis*, a native plant of eastern Asia and commonly called the Korean pine nut, is one of the main types of commercial pine nuts. The lipid content of the Korean pine nut comprises 62% of the total weight of the nut [1]. Pine nuts contain fatty acids with an unusual structure, e.g., $\Delta 5$ -unsaturated polymethylene-interrupted fatty acids ($\Delta 5$ -UPIFAs). These fatty acids are the characteristic components of lipids obtained from conifer seeds and leaves [2]. Pinolenic acid (18:3, $\Delta 5,9,12$) is a major $\Delta 5$ -UPIFA present in pine nuts. Korean pine nut oil (PNO) contains 4% palmitic acid (16:0), 28% oleic acid (18:1, $\Delta 9$), 47% linoleic acid (18:2, $\Delta 9,12$), and 14% pinolenic acid [2, 3].

The health benefits of PNO have been investigated in several studies. Asset et al. [4, 5] reported that PNO lowered total cholesterol and triglyceride levels in animal models. In a study by Sugano et al. [6], consumption of PNO (22% energy) alleviated high blood pressure in spontaneously hypertensive rats after five weeks of feeding. Hughes et al. [7] showed that providing a PNO capsule prior to an ad-libitum buffet lunch resulted in reduced food intake in overweight female subjects. Pasman et al. [8] observed that cholecystokinin and glucagon-like peptide-I

secretion were higher in the subjects who received the PNO capsule than in those who received placebo, thereby supporting the findings by Hughes et al. [7].

Dietary fatty acids, especially polyunsaturated fatty acids (PUFAs), play a major role in regulating immune function by modulating the production of lipid mediators involved in a variety of signaling pathways. In general, n-6 PUFAs are known to promote hyperactive immune responses by providing substrates for pro-inflammatory lipid mediators, whereas consumption of n-3 PUFAs results in the alleviation of pro-inflammatory responses [9]. However, γ -linolenic acid (18:3, Δ 6,9,12), which is an n-6 PUFA, was reported to suppress chronic inflammation by increasing the cellular levels of dihomo- γ -linolenic acid (20:3, Δ 8,11,14) [10]. Dihomo- γ -linolenic acid can compete with arachidonic acid (20:4, Δ 5,8,11,14) as a substrate for cyclooxygenase and lipoxygenase, and it is also a precursor of anti-inflammatory lipid mediators.

Pinolenic acid, which is the positional isomer of γ -linolenic acid, can also be taken up and elongated to form eicosatrienoic acid (20:3, Δ 7,11,14) [11]. Chuang et al. [12] reported that pinolenic acid taken up by cells modified the fatty acid composition of cellular phospholipids, resulting in decreased production of pro-inflammatory eicosanoids in a murine macrophage cell line. In contrast to the in vitro results, production of pro-inflammatory lipid mediators was elevated in animals fed PNO [6, 13]. In a study that examined the effects of a five-week PNO diet (22% energy) on immune parameters [13], the relative proportion of splenic CD4⁺ T lymphocytes, the splenic production of immunoglobulin G and E, and the leukotriene B₄ released from peritoneal exudate cells were higher in rats fed PNO compared with rats fed safflower oil (a source of linoleic acid; n-6, 18:2, Δ 9,12) or

evening primrose oil (a source of γ -linolenic acid; n-6, 18:3, Δ 6,9,12). Therefore, pinolenic acid has the potential to modulate the immune response via a mechanism that may be different from that of other n-6 PUFAs in vivo. However, information regarding the effect of PNO on immune function is limited.

A study by Ferramosca et al. [14] showed that PNO consumption led to less weight gain in mice that were fed a 29% energy fat diet containing PNO (17% energy). Here, we investigated whether PNO reduced weight gain in high-fat diet (HFD)-induced obese mice and whether this effect led to an improvement in immune function. To observe a dose-dependent effect, 10, 20, and 30% of energy was provided by PNO in the HFDs (45% energy fat). The effect of PNO replacement in the control diet (10% energy fat) on immune responses was also investigated. To the best of our knowledge, this is the first study to examine the effect of PNO in a HFD on immune function after long-term feeding in an animal model.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diets

Five-week-old male C57BL/6 mice were purchased (Central Lab Animal Inc., Seoul, Korea) and randomly divided into 8 groups after 3 days of acclimation. Mice were fed the experimental diets for 12 weeks ad libitum. Control diets contained 10% kcal fat from PNO or soybean oil (SBO), e.g., 10% PNO or SBO (PC, SC). The following six different HFDs contained a total of 45% kcal from fat: 10% kcal from PNO or SBO + 35% kcal from lard (P10, S10), 20% kcal from PNO

or SBO + 25% kcal from lard (P20, S20), and 30% kcal from PNO or SBO + 15% kcal from lard (P30, S30). PNO was a gift from Dubio Co., Ltd. (GyeongGi-do, Korea). The composition of the experimental diets is shown in **Table 1**. Mice were housed individually and maintained in an animal facility with controlled temperature ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$) and a 12 h light/12 h dark cycle. SBO was chosen as the control oil because its fatty acid composition is similar to that of PNO, except for its pinolenic acid content. Body weight was recorded once a week, and food intake was measured 4 times a week. At the end of the experimental period, mice were fasted for 12 hours and euthanized by asphyxiation with CO_2 . Blood was collected via cardiac puncture. Serum was separated and stored at -80°C for later analysis. Epididymal, subcutaneous, and perirenal-retroperitoneal fat pads were dissected and weighed. Spleens were aseptically removed and placed in sterile RPMI 1640 media (Lonza, Walkersville, MD) supplemented with 100 kU/L penicillin (Gibco, Carlsbad, CA), 100 mg/L streptomycin (Gibco), 2 mmol/L L-glutamine (Gibco), and 25 mmol/L HEPES (Sigma Aldrich, St Louis, MO) (complete RPMI). This study was approved by the Animal Care and Use Committee at Seoul National University (approval no. SNU-101029-1).

2.2. Isolation of splenocytes

Spleens were minced with the frosted ends of microscope slides (Fisher Scientific, Waltham, MA) in complete RPMI. After centrifugation, red blood cells were lysed using Gey's solution, and the remaining leukocytes were washed twice with complete RPMI. Viable cells were counted by trypan blue staining on a

hemacytometer (Fisher Scientific). Isolated splenocytes were resuspended in complete RPMI containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco) for culture.

2.3. Lymphocyte proliferation

Lymphocyte proliferation was determined using a [^3H] thymidine incorporation assay. Splenocytes (4×10^5 cells/well) were cultured in triplicate with concanavalin A (Con A) (Sigma Aldrich) at 0.5 or 1.5 mg/L (final concentration) or lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Aldrich) at 5, 15, or 30 mg/L (final concentration) in a 96-well flat bottomed plate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) for 72 hours at 37°C in the presence of 5% CO_2 . Each well was pulsed with 18.5 kBq of [^3H] thymidine (Perkin Elmer, Boston, MA) for the last 4 hours of the incubation. Cells were harvested on filter paper using a cell harvester (FilterMate; Perkin Elmer), and radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (MicroBeta; Perkin Elmer). The results are reported as corrected counts per minute (ccpm), which is the average ccpm of the mitogen-stimulated wells minus the average ccpm of the unstimulated wells.

2.4. Cytokine and prostaglandin E_2 (PGE $_2$) production

Splenocytes (5×10^6 cells/well) were stimulated with 5 mg/L of Con A for 48 hours or 10 mg/L of LPS for 24 hours in 24-well plates at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Cell-free supernatants were collected and stored at -80°C. Levels of interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ , IL-6, and IL-1 β were measured by ELISA (BD OptEIA set; BD Pharmingen, San Diego, CA) according to the manufacturer's

instructions. Levels of PGE₂ were measured using a competitive ELISA kit (PGE₂ EIA kit; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI).

2.5. Serum leptin

Serum leptin levels were determined by ELISA (Quantikine[®] ELISA kit; R&D Systems, Minneapolis, MN).

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL). Two-way ANOVA was used to evaluate the overall effects of the fat amount and type used in the diets and the interaction between these parameters. When the effects were significant, an LSD multiple-comparison post-hoc test was performed. A Pearson correlation was used to determine the association between body weight, adipose tissue weight, and serum leptin level. The results from all the comparisons were considered significant at $P < 0.05$. Data were reported as the mean \pm SE.

3. Results

3.1. Weight gain, white adipose tissue weight and energy intake

Weight gain, white adipose tissue weight, and energy intake were significantly affected by the amount and type of fat used in the diets. No significant interaction was observed (**Table 2**).

Replacement of SBO with PNO resulted in less weight gain and less white

adipose tissue in mice fed the HFDs. Mice in the P10 ($P = 0.01$), P20 ($P = 0.01$), and P30 ($P = 0.02$) groups gained less body weight than the mice in the S10, S20, and S30 groups, respectively, after 12 weeks on the diet. Mice in the P10 ($P = 0.04$), P20 ($P = 0.07$), and P30 ($P = 0.02$) groups had less white adipose tissue than those in the S10, S20, and S30 groups, respectively. PNO consumption also led to less white adipose tissue in mice fed the control diets ($P = 0.05$). A significantly positive correlation was observed between weight gain and white adipose tissue weight ($r = 0.91$, $P < 0.001$).

Inclusion of PNO in the HFD resulted in less energy intake than the inclusion of SBO in the HFD, and this was due to less food intake. Mice in the P30 group consumed significantly less energy than those in the S30 group ($P < 0.001$). In mice fed the control diets, there was no significant difference in energy intake between the PC and SC groups. These data indicate that the reduced weight gain in the mice fed the PNO-containing HFDs was mainly due to a decrease in adiposity and might be partly mediated by a reduction in food intake.

3.2. Serum leptin

Overall, serum leptin levels were higher in mice fed the HFDs than those fed the control diets ($P < 0.001$), and PNO replacement resulted in lower serum leptin levels ($P < 0.001$) (**Figure 1**). Mice in the P10 group had significantly lower serum leptin levels than those in the S10 group ($P = 0.04$). The serum leptin level showed a significantly positive correlation with weight gain ($r = 0.88$, $P < 0.001$) and white adipose tissue weight ($r = 0.90$, $P < 0.001$), supporting the contention that PNO decreased adiposity.

3.3. Lymphocyte proliferation

Overall, the proliferative response of splenocytes to Con A at 0.5 mg/L tended to be higher in mice fed the HFDs compared with mice fed the control diets ($P = 0.08$), and consumption of PNO generally resulted in higher proliferative responses of splenocytes to Con A at 0.5 mg/L ($P = 0.09$) (**Table 3**). The proliferative response of splenocytes to Con A at 1.5 mg/L or to LPS at 5, 15, and 30 mg/L was not significantly affected by the amount or type of fat used in the diets.

3.4. Cytokine and PGE₂ production

Overall, the production of IL-1 β by splenocytes stimulated with 10 mg/L of LPS was significantly higher in mice fed PNO ($P = 0.04$), whereas the amount of fat did not have a significant effect (**Table 4**). There was no significant influence of the amount or type of fat on the production of IL-2, IFN- γ , IL-6, or PGE₂.

4. Discussion

PNO has been reported to have beneficial effects on lipid metabolism [11, 15], blood pressure [6], appetite control [7, 8], and eicosanoid production [12]. However, few studies have been conducted to determine the effects of PNO on immune function [13]. We focused on whether PNO consumption could influence weight gain and whether the impact of PNO on reduced weight gain resulted in an improvement in immune function in HFD-induced obese mice. We showed that mice fed a PNO-containing HFD gained less body weight and had less adipose tissue than mice fed an SBO-containing HFD. Dose-dependent effects of PNO on

weight gain and white adipose tissue weight were not observed among the different doses of PNO tested in this study.

PNO consumption tended to increase lymphocyte proliferation when the cells were stimulated with Con A at 0.5 mg/L, but it did not have any significant influence on lymphocyte proliferation when the cells were stimulated with Con A at 1.5 mg/L or with LPS at 5, 15, or 30 mg/L. Thus, it is inconclusive whether consumption of PNO resulted in improved lymphocyte proliferation. Additionally, we cannot conclude that the higher lymphocyte proliferation observed upon Con A stimulation at 0.5 mg/L in mice fed PNO was due to less weight gain and lower adipose tissue weight because obese mice tended to have higher lymphocyte proliferation upon treatment with Con A at 0.5 mg/L as well.

Obesity has been linked to immunosuppression [16]. It was reported that the proliferative response to T cell mitogens was significantly lower in both diet-induced and genetically obese models [17, 18]. However, reports have been inconsistent on whether obesity results in a reduced proliferative response of immune cells. Boissonneault and Harrison [19] demonstrated that splenocyte proliferation in response to T cell mitogens in young or adult genetically obese mice was greater than that in lean mice. In a study by Mito et al. [20], proliferation of splenocytes to T cell mitogens in diet-induced obese mice was higher than that in lean mice, although the difference was not significant. It was also observed that peripheral blood mononuclear cell proliferation in response to T cell mitogens was not significantly different in young (24- to 34-year-old) obese human subjects who did not have metabolic disorders [21]. In the current study, we did not observe diminished proliferative responses in lymphocytes from obese mice. Instead, the

lymphocyte proliferative response to Con A at 0.5 mg/L tended to be higher in obese mice compared with the lean control mice. There is a possibility that the higher proliferation of lymphocytes from obese animals could be a result of T cell prematuration [19], especially at early adulthood.

Ahmed et al. [22] reported that energy restriction enhanced T cell-mediated immune responses in the obese. Tanaka et al. [23] reported that the altered T cell function observed in the obese was corrected after adequate weight reduction. In the current study, mice fed the HFD with PNO gained 17% less weight than mice fed the HFD with SBO. However, reduced weight gain did not result in an overall improvement in lymphocyte proliferative responses to T cell mitogens. It is worth noting that the beneficial effects of energy restriction on immune responses have been observed to be in the range of 20% to 60% in most studies using animal models [24]. The magnitude of the reduction in energy intake in this study was insufficient to have a significant influence on lymphocyte proliferation because mice fed the HFD with PNO consumed 4% less energy than those fed the HFD with SBO. The beneficial effects of energy restriction are more prominent in autoimmune disease and aging models because the beneficial effects are associated with low production of pro-inflammatory cytokines and enhanced activity of antioxidant defense enzymes [24]. However, the reduced production of inflammatory cytokines observed during energy restriction impaired natural killer cell activation and led to greater host susceptibility to influenza infection [25]. The latter data suggest that energy restriction can result in distinct consequences depending on the condition of the host and the type of infection. Further study is needed to better define the effect of the PNO-mediated energy restriction in the

HFD during immune challenge.

Splenocyte production of IL-1 β was significantly higher in mice fed PNO than in mice fed SBO. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine that facilitates T cell proliferation and activation [26, 27]. In a study by Matsuo et al. [13], consumption of PNO (22% kcal) for five weeks resulted in higher leukotriene B₄ release from rat peritoneal exudate cells when compared with other oil groups. These results suggest that PNO might have an immunoactivating effect by facilitating the inflammatory response, which is a mandatory process for promoting appropriate immune responses, although the mechanism remains to be delineated. PGE₂ levels were not significantly different between the two oil groups, although IL-1 β is known to induce PGE₂ production. The lack of a difference in PGE₂ levels may be due to substrate competition; the plasma membrane of splenocytes of mice fed PNO contains pinolenic acid, which counteracts the effect of IL-1 β -induced PGE₂ synthesis. The latter speculation is supported by a previous study [12].

In the current study, we showed that consumption of a HFD partially substituted with PNO for 12 weeks led to reduced weight gain, which was mainly due to less white adipose tissue in the mice. The effect of lower weight gain did not result in an overall enhancement of the proliferative responses of splenocytes. As the production of IL-1 β by splenocytes was higher in mice fed PNO, there is a possibility that PNO can activate the immune response, but further studies are needed to determine the mechanisms of the effect of PNO on IL-1 β production and whether PNO affects the production of other inflammatory markers.

References

- [1] The Rural Development Administration. Food Composition Table, 8th Revision. Suwon: The Rural Development Administration; 2011.
- [2] Wolff RL, Pedrono F, Pasquier E, Marpeau AM. General characteristics of *Pinus* spp. seed fatty acid compositions, and importance of delta5-olefinic acids in the taxonomy and phylogeny of the genus. *Lipids* 2000;35:1-22.
- [3] Lee JW, Lee KW, Lee SW, Kim IH, Rhee C. Selective increase in pinolenic acid (all-cis-5,9,12-18:3) in Korean pine nut oil by crystallization and its effect on LDL-receptor activity. *Lipids* 2004;39:383-7.
- [4] Asset G, Bauge E, Wolff RL, Fruchart JC, Dallongeville J. *Pinus pinaster* oil affects lipoprotein metabolism in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 1999;129:1972-8.
- [5] Asset G, Staels B, Wolff RL, Bauge E, Madj Z, Fruchart JC, Dallongeville J. Effects of *Pinus pinaster* and *Pinus koraiensis* seed oil supplementation on lipoprotein metabolism in the rat. *Lipids* 1999;34:39-44.
- [6] Sugano M, Ikeda I, Wakamatsu K, Oka T. Influence of Korean pine (*Pinus koraiensis*)-seed oil containing cis-5,cis-9,cis-12-octadecatrienoic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism, eicosanoid production and blood pressure of rats. *Br J Nutr* 1994;72:775-83.
- [7] Hughes GM, Boyland EJ, Williams NJ, Mennen L, Scott C, Kirkham TC, Harrold JA, Keizer HG, Halford JC. The effect of Korean pine nut oil (PinnoThin) on food intake, feeding behaviour and appetite: a double-blind placebo-controlled trial. *Lipids Health Dis* 2008;7:6.

- [8] Pasman WJ, Heimerikx J, Rubingh CM, van den Berg R, O'Shea M, Gambelli L, Hendriks HF, Einerhand AW, Scott C, Keizer HG, Mennen LI. The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids Health Dis* 2008;7:10.
- [9] Galli C, Calder PC. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann Nutr Metab* 2009;55:123-39.
- [10] Kapoor R, Huang YS. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Curr Pharm Biotechnol* 2006;7:531-4.
- [11] Tanaka T, Hattori T, Kouchi M, Hirano K, Satouchi K. Methylene-interrupted double bond in polyunsaturated fatty acid is an essential structure for metabolism by the fatty acid chain elongation system of rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1998;1393:299-306.
- [12] Chuang LT, Tsai PJ, Lee CL, Huang YS. Uptake and incorporation of pinolenic acid reduces n-6 polyunsaturated fatty acid and downstream prostaglandin formation in murine macrophage. *Lipids* 2009;44:217-24.
- [13] Matsuo N, Osada K, Kodama T, Lim BO, Nakao A, Yamada K, Sugano M. Effects of gamma-linolenic acid and its positional isomer pinolenic acid on immune parameters of brown-Norway rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;55:223-9.
- [14] Ferramosca A, Savy V, Einerhand AWC, Zara V. Pinus koraiensis seed oil (PinnoThin) supplementation reduces body weight gain and lipid concentration in liver and plasma of mice. *J Anim Feed Sci* 2008;17:621-30.
- [15] Tanaka T, Takimoto T, Morishige J, Kikuta Y, Sugiura T, Satouchi K. Non-methylene-interrupted polyunsaturated fatty acids: effective substitute for

arachidonate of phosphatidylinositol. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:683-8.

[16] Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, Fagoaga OR. Influence of Obesity on Immune Function. *J Am Diet Assoc* 1999;99:294-9.

[17] Sato Mito N, Suzui M, Yoshino H, Kaburagi T, Sato K. Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice. *J Nutr Health Aging* 2009;13:602-6.

[18] Moriguchi S, Kato M, Sakai K, Yamamoto S, Shimizu E. Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of glucose transporter 1 (GLUT-1). *Am J Clin Nutr* 1998;67:1124-9.

[19] Boissonneault GA, Harrison DE. Obesity minimizes the immunopotential of food restriction in ob/ob mice. *J Nutr* 1994;124:1639-46.

[20] Mito N, Hosoda T, Kato C, Sato K. Change of cytokine balance in diet-induced obese mice. *Metabolism* 2000;49:1295-300.

[21] Han SN, Jeon KJ, Kim MS, Kim HK, Lee AJ. Obesity with a body mass index under 30 does not significantly impair the immune response in young adults. *Nutr Res* 2011;31:362-9.

[22] Ahmed T, Das SK, Golden JK, Saltzman E, Roberts SB, Meydani SN. Calorie Restriction Enhances T-Cell-Mediated Immune Response in Adult Overweight Men and Women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009;64A:1107-13.

[23] Tanaka S, Isoda F, Ishihara Y, Kimura M, Yamakawa T. T lymphopaenia in relation to body mass index and TNF-alpha in human obesity: adequate weight

reduction can be corrective. Clin Endocrinol 2001;54:347-54.

[24] Jolly CA. Dietary restriction and immune function. J Nutr 2004;134:1853-6.

[25] Gardner EM, Beli E, Clinthorne JF, Duriancik DM. Energy intake and response to infection with influenza. Annu Rev Nutr 2011;31:353-67.

[26] Joseph SB, Miner KT, Croft M. Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1 and TNF. Eur J Immunol 1998;28:277-89.

[27] Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I, Dinarello CA, Paul WE. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:7119-2.

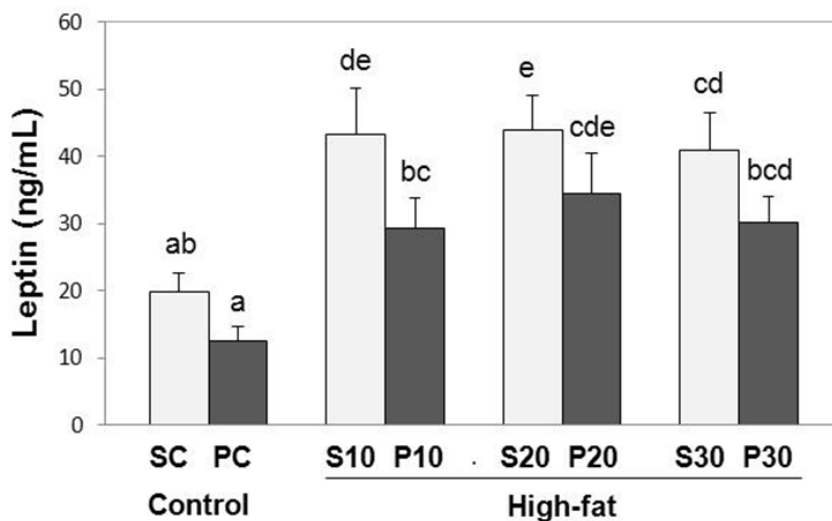


Figure. 1. Serum leptin levels in mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil (SC, n=10; PC, n=11; S10, n=11; P10, n=11; S20, n=11; P20, n=10; S30, n=12; P30, n=12)

Values are presented as the mean \pm SE. Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and type, followed by an LSD post-hoc test. Labeled means without a common letter represent significant differences ($P < 0.05$). Serum leptin levels were determined by ELISA.

Table 1. Composition of the experimental diets (g)^a

	Control (10% kcal Fat)	High-fat (45% kcal Fat)		
	10% Oil	10% Oil +35% Lard	20% Oil +25% Lard	30% Oil +15% Lard
Casein	191	236	236	236
L-Cystine	2.9	3.5	3.5	3.5
Sucrose	335	204	204	204
Cornstarch	301	86	86	86
Dyetrose	33	118	118	118
PNO ^b or SBO	43	53	106	159
Lard	0	186	133	80
t-Butylhydroquinone	0.009	0.01	0.02	0.03
Cellulose	48	59	59	59
Mineral mix ^c	33	41	41	41
Vitamin mix ^d	10	12	12	12
Choline bitartrate	1.9	2.4	2.4	2.4
kcal/g diet	3.7	4.6	4.6	4.6

^aResource: Dyets, Inc, Bethlehem, PA, USA.

^bPNO was a gift from Dubio Co., Ltd. (GyeongGi-do, Korea).

^cThirty-three grams of mineral mix (Dyets, #210099) provides 4.9 g calcium, 3.8 g phosphorus, 3.4 g potassium, 0.9 g sodium, 1.5 g chloride, 0.5 g magnesium, 0.3 g sulfur, 55 mg manganese, 33 mg iron, 28 mg zinc, 6 mg copper, 0.2 mg selenium, 0.2 mg iodine and 3.9 g sucrose.

^dTen grams of vitamin mix (Dyets, #300050) provides 4,000 IU vitamin A, 1,000 IU vitamin D₃, 50 IU vitamin E, 30 mg niacin, 16 mg pantothenic acid, 7 mg vitamin B₆, 6 mg vitamin B₁, 6 mg vitamin B₂, 2 mg folic acid, 0.8 mg menadione, 0.2 mg biotin, 10 µg vitamin B₁₂ and 9.8 g sucrose.

Table 2. Body weight, weight gain, white adipose tissue weight, food intake and energy intake of mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil

	Soybean oil				Pine nut oil				Fat amount, <i>P</i> value	Fat type, <i>P</i> value	Interaction, <i>P</i> value
	Control	High-fat			Control	High-fat					
	SC (n=10)	S10 (n=11)	S20 (n=11)	S30 (n=12)	PC (n=11)	P10 (n=11)	P20 (n=10)	P30 (n=12)			
Body weight at 0 wk (g)	17.3 ±0.5	17.0 ±0.4	17.1 ±0.3	16.8 ±0.4	16.7 ±0.4	17.0 ±0.3	16.9 ±0.4	16.7 ±0.4	0.92	0.54	0.91
Body weight at 12 wk (g)	32.8 ±1.0 ^{ab}	38.5 ±1.4 ^{de}	39.4 ±1.1 ^e	38.0 ±1.2 ^{de}	30.5 ±0.6 ^a	34.6 ±1.4 ^{bc}	35.4 ±1.1 ^{bcd}	34.6 ±1.2 ^{bc}	<0.001	<0.001	0.88
Weight gain (g)	15.5 ±0.8 ^{ab}	21.5 ±1.4 ^{cd}	22.3 ±1.0 ^d	21.2 ±0.9 ^{cd}	13.8 ±0.6 ^a	17.5 ±1.3 ^b	18.5 ±1.0 ^{bc}	17.8 ±1.1 ^b	<0.001	<0.001	0.71
White adipose tissue weight (g) ^a	3.1 ±0.2 ^b	5.3 ±0.4 ^d	5.4 ±0.3 ^d	5.3 ±0.3 ^d	2.2 ±0.2 ^a	4.4 ±0.4 ^c	4.6 ±0.4 ^{cd}	4.2 ±0.3 ^c	<0.001	<0.001	0.99
Average daily Food intake (g/d)	3.20 ±0.06 ^d	2.82 ±0.05 ^{bc}	2.86 ±0.03 ^{bc}	2.89 ±0.05 ^c	3.20 ±0.03 ^d	2.76 ±0.04 ^{ab}	2.77 ±0.03 ^{abc}	2.68 ±0.05 ^a	<0.001	0.01	0.11
Average daily energy intake (kcal/d) ^b	11.8 ±0.2 ^a	13.1 ±0.2 ^{cd}	13.3 ±0.1 ^{cd}	13.4 ±0.2 ^d	11.8 ±0.1 ^a	12.8 ±0.2 ^{bc}	12.9 ±0.2 ^{bcd}	12.4 ±0.2 ^b	<0.001	0.01	0.08

Values are presented as the mean \pm SE. Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and type, followed by an LSD post-hoc test. Means in a row without a common superscript represent significant differences ($P < 0.05$).

^aWhite adipose tissue weight is the sum of the weights of epididymal, subcutaneous, and perirenal-retroperitoneal depots.

^bAverage daily energy intake (kcal/d) = Average daily food intake (g/d) \times Calories per g diet (kcal/g diet).

Table 3. The proliferative responses of splenocytes from mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil ($\times 10^3$ ccpm).

	Soybean oil				Pine nut oil				Fat amount, <i>P</i> value	Fat type, <i>P</i> value	Interaction <i>P</i> value
	Control	High-fat			Control	High-fat					
	SC (n=10)	S10 (n=11)	S20 (n=11)	S30 (n=12)	PC (n=11)	P10 (n=11)	P20 (n=10)	P30 (n=12)			
Con A, mg/L											
0.5	134±22	194±20	191±17	189±20	180±17	220±19	209±21	198±24	0.08	0.09	0.83
1.5	158±27	201±28	198±19	188±24	202±16	195±17	152±23	194±26	0.75	0.98	0.30
LPS, mg/L											
5	70±10	72±8	83±9	74±7	83±8	66±10	71±8	63±11	0.66	0.48	0.50
15	74±11	80±8	86±9	78±9	89±10	75±10	78±9	70±12	0.83	0.87	0.61
30	68±14	82±12	84±11	73±13	84±12	69±13	76±12	66±14	0.85	0.74	0.68

Values are presented as the mean \pm SE. Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and type.

Splenocytes (4×10^5 cells/well) were stimulated with Con A or LPS in 96-well flat bottomed plates for 72 hours at 37°C in the presence of 5% CO₂. Final concentrations of mitogens were 0.5 and 1.5 mg/L for Con A and 5, 15 and 30 mg/L for LPS. Lymphocyte proliferation was measured by assessing [³H] thymidine incorporation during the last 4 hours of incubation. The results are reported as ccpm, which is the average cpm of the mitogen-stimulated wells minus the average cpm of the unstimulated wells.

Table 4. The production of cytokines and PGE₂ by splenocytes from mice fed control diets or high-fat diets containing pine nut oil or soybean oil

	Soybean oil				Pine nut oil				Fat amount, <i>P</i> value	Fat type, <i>P</i> value	Interaction , <i>P</i> value
	Control	High-fat			Control	High-fat					
	SC (n=10)	S10 (n=11)	S20 (n=11)	S30 (n=12)	PC (n=11)	P10 (n=11)	P20 (n=10)	P30 (n=12)			
Con A, 5 mg/L											
IL-2 (ng/L)	217±37	292±54	287±59	237±48	189±26	223±33	239±60	199±24	0.47	0.15	0.97
IFN-γ (μg/L)	1.9±1.0	1.4±0.6	1.6±0.7	1.2±0.4	1.7±0.6	1.1±0.4	2.9±2.3	1.2±0.4	0.66	0.76	0.82
LPS, 10 mg/L											
IL-6 (μg/L)	1.7±0.2	1.9±0.2	2.2±0.1	2.0±0.1	2.0±0.1	2.1±0.2	2.1±0.2	2.0±0.2	0.36	0.43	0.78
IL-1β (ng/L)	38±9 ^a	52±18 ^{ab}	41±11 ^{ab}	53±18 ^{ab}	53±13 ^{ab}	71±20 ^{ab}	72±16 ^{ab}	82±15 ^b	0.55	0.04	0.95
PGE ₂ (ng/L)	683±171	637±81	644±97	475±81	451±73	563±66	864±399	597±159	0.57	0.94	0.54

Values are presented as the mean ± SE. Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and type, followed by an LSD post-hoc test. Means in a row without a common superscript represent significant differences ($P < 0.05$).

Splenocytes (5×10^6 cells/well) were stimulated with Con A (5 mg/L, final concentration) for 48 hours or LPS (10 mg/L, final concentration) for 24 hours in 24-well plates at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cell-free supernatants were collected, and the levels of IL-2, IFN-γ, IL-6, IL-1β, and PGE₂ were measured by ELISA.

Abstract

The effect of pine nut oil on the development of hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese mice

Soyoung Park
Department of Food and Nutrition
The graduate School
Seoul National University

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been becoming a major public health problem with obesity epidemic. Thus, development of an effective dietary approach is required for prevention of NAFLD. Korean pine nut oil (PNO) has been reported to have some influence on appetite control and lipid metabolism. PNO also has the potential as a food component that can be used for the NAFLD prevention by its beneficial effect on weight management and lipid metabolism, but the information regarding the role of PNO on NAFLD prevention is still limited. We examined whether PNO replacement in high-fat diet (HFD) can ameliorate

HFD-induced hepatic steatosis compared to soybean oil (SBO). Five-week-old C57BL/6 mice were fed control diets consisting of 10% calorie fat from either PNO (PC) or SBO (SC) or HFDs consisting of 45% calorie fat from 10% PNO or SBO and 35% lard (P10, S10), 20% PNO or SBO and 25% lard (P20, S20), or 30% PNO or SBO and 15% lard (P30, S30) for 12 weeks. We measured body weight, food intake, liver lipids level, mRNA level of genes involved in lipid oxidation and lipogenic pathways, and protein expression of SIRT (sirtuin) 3. Mice in P10, P20, and P30 group gained less body weight and had less white adipose tissue compared to those in S10, S20, and S30 group. It indicates PNO suppressed body weight gain and white adipose tissue accumulation in HFD-induced obesity. Mice in PC group also had less white adipose tissue than those in SC group. Mice in P30 group had significantly less caloric intake than those in S30 group, but caloric intake of mice in PC, P10, and P20 group was not significantly different from those in SC, S10, and S20 group. P10 group had significantly lower hepatic triglyceride (TG) level than S10 group. Further experiments were performed to examine mechanisms responsible for the effect of PNO on hepatic TG reduction in 4 groups, which was SC, PC, S10, and P10 group. Overall, hepatic *Acadl* (long-chain acyl-CoA dehydrogenase) mRNA level was higher in PNO-fed mice, which might mediated the lower accumulation of hepatic TG in P10 group by increasing β -oxidation of fatty acid. Hepatic *Pparg* (peroxisome proliferator activated receptor gamma)

mRNA level was lower in PC group compared to SC group. Protein expression of SIRT 3 in white adipose tissue was downregulated in S10 group and was restored in P10 group to the level of control lean mice. These results suggest that PNO could alleviate mitochondrial dysregulation or damage by restoring SIRT3 protein expression in HFD-induced obese mice. In conclusion, PNO consumption resulted in less body fat accumulation and attenuated hepatic steatosis in HFD-induced obesity, which seemed to be a result of caloric restriction-mimetic response.

Keywords: Pine nut oil, high-fat diet, hepatic steatosis, SIRT3